

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BROKOLI (*Brassica oleracea* L.)
TERHADAP MALFORMASI STRUKTUR ANATOMI VERTEBRA PADA JANIN
TIKUS PUTIH STRAIN WISTAR (*Rattus norvegicus*) YANG DIPAPARKAN
OLEH KAFEIN**

TUGAS AKHIR
Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kebidanan



OLEH :
FARISA ARIFFATIN
NIM. 135070600111029

PROGRAM STUDI S1 KEBIDANAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2017

DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Judul	i
Halaman Pengesahan.....	ii
Halaman Pernyataan Keaslian	iii
Kata Pengantar	iv
Abstrak	vi
<i>Abstract</i>	vii
Daftar Isi.....	viii
Daftar Tabel.....	xi
Daftar Gambar.....	xii
Daftar Simbol,Singkatan,dan Istilah.....	xiii
Daftar Lampiran.....	xiv

BAB I Pendahuluan

1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	5

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kafein	6
2.1.1 Karakteristik Kafein	6
2.1.2 Sumber dan Pemakaian Kafein	7
2.1.3 Farmakokinetik Kafein	8
2.1.4 Mekanisme Kerja Kafein.....	8
2.1.5 Efek Jangka Pendek Kafein.....	10

2.1.6 Efek Jangka Panjang Kafein.....	11
2.1.7 Metabolisme Kafein Dalam Tubuh Janin.....	11
2.1.8 Kafein Menghasilkan Radikal Bebas.....	12
2.1.9 Radikal Bebas	12
2.1.10 Stres Oksidatif.	14
2.1.11 Kerusakan DNA.....	16
2.2 Brokoli (<i>Brassica oleracea L.</i>)	18
2.2.1 Klasifikasi Brokoli	18
2.2.2 Kandungan Kimia Brokoli	19
2.2.3 Kandungan Vitamin A Pada Brokoli.....	19
2.2.4 Kandungan Vitamin C pada Brokoli	19
2.2.5 Antioksidan.....	20
2.2.6 Flavonoid.....	21
2.2.7 Manfaat	23
2.3 Periode Embrionik.....	23
2.3.1 Malformasi.....	31
2.3.2 Malformasi Struktur Anatomi Vertebra	32
2.3.3 Embriologi Vertebra.....	33
2.3.4 Mekanisme Terjadinya Malformasi Struktur Anatomi Vertebra.....	34
2.3.5 Teratologi	36
2.3.6 Prinsip Zat Teratogen	36
2.3.7 Klasifikasi <i>Food and Drugs Administration</i>	38
2.3.8 Mekanisme Genetik dan Fisiologi Teratogenitas.....	39
2.4 Tikus	40
2.4.1 Klasifikasi	40
2.4.2 Deskripsi Fisik	42

2.4.3 Reproduksi Tikus Betina	42
2.4.4 Siklus Reproduksi.....	43
2.4.5 Periode Embrionik Tikus.....	44
2.4.6 Mekanisme Malformasi Struktus Anatomi Vertebra Tikus	47

BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konsep	49
3.2 Penjelasan Kerangka Konsep.....	50
3.3 Hipotesis Penelitian	52

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian.....	53
4.2 Populasi dan Sampel.....	53
4.2.1 Kriteria Inklusi dan Eksklusi	54
4.3 Variabel Penelitian.....	55
4.3.1 Variabel Bebas.....	55
4.3.2 Variabel Terikat.....	55
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	55
4.5 Alat dan Bahan	55
4.6 Definisi Operasional.....	56
4.7 Prosedur Penelitian.....	58
4.7.1 Aklimatisasi.....	60
4.7.2 Perawatan Tikus	60
4.7.3 Pengawinan Hewan Percobaan	60
4.7.4 Ekstraksi	61
4.7.5 Maserasi	61
4.8 Langkah Penelitian	61
4.9 Analisis Data.....	67

BAB V HASIL DAN ANALISA PENELITIAN

5.1 Hasil Penelitian67

5.2 Analisis Data.....78

BAB VI PEMBAHASAN82

BAB VII PENUTUP

7.1 Kesimpulan.....87

7.2 Saran.....87

DAFTAR PUSTAKA.....88

LAMPIRAN.....95

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Klasifikasi <i>Food and Drug Administration</i>	38
Tabel 4.1 Larutan Penjernih.....	64
Tabel 5.1 Uji Comparison	80

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Rumus Bangun Kafein	6
Gambar 2.2 <i>Human Critical Periods of Development</i>	31
Gambar 3.1 Kerangka Konsep.....	49
Gambar 4.1 Prosedur Penelitian.....	59
Gambar 5.1 Penampangan samping tubuh janin tikus dengan pewarnaan alizarin red. Tulang belakang yang normal	70
Gambar 5.2 Jumlah ruas tulang belakang pada kelompok kontrol positif (+).....	71
Gambar 5.3 Jumlah ruas tulang belakang kelompok perlakuan I.....	71
Gambar 5.4 Jumlah ruas tulang belakang kelompok perlakuan II.....	72
Gambar 5.5 Jumlah ruas tulang belakang kelompok perlakuan III.....	72
Gambar 5.6 Sudut kebengkokan tulang belakang kelompok kontrol positif.....	73
Gambar 5.7 Sudut kebengkokan tulang belakang pada kelompok perlakuan I.....	73
Gambar 5.8 Sudut kebengkokan tulang belakang pada kelompok perlakuan II	74
Gambar 5.9 Sudut kebengkokan tulang belakang pada kelompok perlakuan III.....	74
Gambar 5.10 Janin Tampak Tidak Berkembang.....	75
Gambar 5.11 Kulit Janin Tampak Pucat.....	75
Gambar 5.12 Jarak Antar Rusuk Terlihat Meregang.....	76
Gambar 5.13 Tulang Belakang (Lumbal) Terlihat Melengkung.....	76
Gambar 5.14 Janin Tampak Tidak Terbentuk.....	77
Gambar 5.15 Perkembangan Tidak Sempurna dan Kulit Tampak Tidak Ada.....	77
Gambar 5.16 Tulang Belakang (Lumbal) Terlihat Melengkung.....	78

DAFTAR SIMBOL, SINGKATAN, DAN ISTILAH

IUPAC	: <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
FDA	: <i>Food and Drugs Administration</i>
DNA	: <i>Deoxyribose Nucleid Acid</i>
RNA	: <i>Rybo Nucleic Acid</i>
XO	: <i>Xanthine Oksidase</i>
OFR	: <i>Oxygene Free Radical</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
MDA	: <i>Malondyaldehyde</i>
PUFA	: <i>Poly Unsaturated Fatty Acid</i>
SOD	: <i>Superoksida Dismutase</i>
FDA	: <i>Food and Drug Administration</i>
LH	: <i>Luteinizing Hormone</i>
OH	: <i>Oksigen Hidroksida</i>
KL	: <i>Korpus Luteum</i>
FSH	: <i>Folicle Stimulating Hormone</i>
NaCl	: <i>Natrium Klorida</i>
DMF	: <i>Dimetilformamida</i>
DMSO	: <i>Dimetilsulfoksida</i>
RA	: <i>Retinoat Acid</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
PAX	: <i>Paired-box</i>
HOX	: <i>Homeobox</i>
GST	: <i>Glutathion S-transferase</i>

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Analisis Statistik	95
Lampiran 2 Prosedur Pewarnaan Alizarin Red	98
Lampiran 3 Dokumentasi Penelitian.....	99

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BROKOLI (*Brassica oleracea* L.)
TERHADAP MALFORMASI STRUKTUR ANATOMI VERTEBRA PADA JANIN
TIKUS PUTIH STRAIN WISTAR (*Rattus norvegicus*) YANG DIPAPARKAN
KAFEIN**

Oleh :

Farisa Ariffatin

NIM 135070600111029

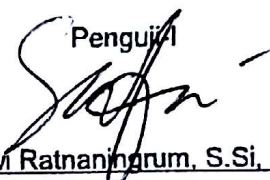
Telah diuji pada

Hari : Jumat

Tanggal : 14 Juli 2017 .

dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji-I



Safrina Dewi Ratnaningrum, S.Si, M.Si, Med

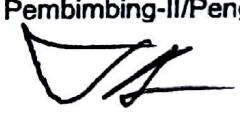
NIP.197403182005012001

Pembimbing-I/Penguji-II

Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes

NIP. 195505121987012001

Pembimbing-II/Penguji-III



Dr. dr. Tatit Nurseta, Sp.OG(K)

NIP. 196709091997031001



Ketua Program Studi S1 Kebidanan,

Linda Ratna Wati, SST., M.Kes

NIP. 198409132014042001

ABSTRAK

Ariffatin, Farisa. 2017. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Brokoli (Brassica oleracea L.) Terhadap Malformasi Struktur Anatomi Vertebra Pada Janin Tikus Putih Strain Wistar (Rattus norvegicus) Yang Dipaparkan Oleh Kafein*. Tugas Akhir, Program Studi S1 Kebidanan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Pembimbing : (1) Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes (2) Dr. dr. Tatit Nurseta, Sp.OG(K).

Kelainan bawaan merupakan masalah global terutama di negara berkembang. Di Indonesia prevalensi kelainan bawaan mencapai angka 5 per 1.000 kelahiran. Sekitar 10% dari semua defek saat lahir disebabkan oleh faktor lingkungan, yang disebut teratogen. Kafein bersifat teratogen tidak spesifik sehingga memungkinkan adanya jenis kecacatan yang ditemukan pada berbagai organ. Kafein berpotensi untuk mempengaruhi perkembangan fetoplasental bila dikonsumsi selama kehamilan. Malformasi telah dibuktikan pada tikus dengan dosis kafein 80 mg/kgBB dapat mempengaruhi pembentukan tulang belakang. Salah satu efek kafein yaitu dapat mendukung produksi radikal bebas. Reaksi radikal bebas ini dapat dilawan dengan pengaruh zat antioksidan. Antioksidan golongan flavonoid adalah antioksidan yang memiliki potensi untuk mencegah pembentukan radikal bebas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh dari ekstrak brokoli sebagai antioksidan pada kejadian malformasi struktur anatomi vertebra (tulang belakang) yang dipaparkan dengan kafein. Desain penelitian yang digunakan adalah *true experiment* dengan rancangan *randomized post test only controlled group design*. Dari 25 tikus betina dibagi ke dalam 5 kelompok dan diberi perlakuan yang berbeda tiap kelompok. Hasil analisis statistik menunjukkan nilai signifikansi $p=0.118$ secara kuantitatif terdapat perbedaan jumlah malformasi yang lebih banyak, namun secara statistik perbedaan tersebut tidak signifikan. Dapat disimpulkan bahwa pada ekstrak brokoli mempengaruhi kejadian malformasi struktur anatomi vertebra pada tikus betina yang dipaparkan oleh kafein.

Kata kunci : Malformasi struktur anatomi vertebra, kafein, ekstrak brokoli, antioksidan, radikal bebas

ABSTRACT

Ariffatin, Farisa. 2017. *Effect of Broccoli Extract (Brassica oleracea L.) on the Malformation Structure Anatomy of Vertebra in Fetus White Rat Strain Wistar (Rattus norvegicus) Exposed By Caffeine. Final Assignment, Bachelor of Midwifery Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University, Supervisors : (1) Dr. dr. Umi Kalsum, M.Kes (2) Dr. dr. Tatit Nurseta, Sp.OG(K).*

Congenital abnormalities are a global problem especially in developing countries. In Indonesia the prevalence of congenital abnormalities reach 5 per 1,000 births and about 10% of all defects at birth are caused by teratogens. Caffeine is teratogenic in nature, allowing for the type of disability found in various organs. Caffeine has the potential to affect the development of fetoplasental when consumed during pregnancy. Malformations have been demonstrated in mice with a dose of caffeine 80 mg / kgBB can affect the formation of the spine. One of the effect of caffeine is that it can support the production of free radicals. This free radical reaction can be resisted by the influence of antioxidants. Flavonoid is a class of antioxidants that have the potential to prevent the formation of free radicals. This study aims to determine the effect of broccoli extract as an antioxidant on the occurrence of malformations of the vertebral anatomical structure (spine) exposed by caffeine. The research design used was true experiment with randomized post test only controlled group design. From 25 female rats divided into 5 groups and treated differently each group. The result of statistical analysis shows that the significance value $p = 0.118$, quantitatively there is a difference of the number of malformations more, but statistically the difference is not significant. To conclude that the broccoli extract affects the incidence of malformations of the vertebrae anatomical structure in female rats exposed by caffeine.

Keywords : Malformation structure anatomy of vertebrae, caffeine, Broccoli extract, antioxidant, Free radicals

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kehamilan merupakan penyatuan dari spermatozoa dan ovum yang dilanjutkan dengan nidasi atau implantasi (Prawirohardjo, 2008). Selanjutnya bila kehamilan terjadi akan diikuti dengan perubahan fisiologi dan perubahan psikologis pada ibu (Saminem, 2009). Dalam kehamilan, terdapat fase organogenesis yang merupakan diferensiasi pembentukan organ tubuh, sehingga fase ini merupakan fase paling peka terjadinya malformasi (Santoso *et al.*, 2004).

Malformasi kongenital diakibatkan oleh abnormalitas diferensiasi jaringan selama tahap perkembangan dini atau interaksi abnormal dari perkembangan sel – sel selama perkembangan organ – organ dan sistem organ janin (Curtis, 2000). Kelainan bawaan merupakan masalah global dengan kejadian lebih besar di negara berkembang (Christensen, 2006). Sekitar 15 juta bayi dilahirkan di dunia setiap tahun, lebih dari satu juta dari bayi tersebut meninggal segera setelah dilahirkan dan banyak yang tidak terhitung jumlahnya menderita kecacatan sepanjang hayat secara fisik atau neurologis (Depkes RI, 2012). Di Asia Tenggara, jumlah penderita kelainan bawaan cukup tinggi yaitu mencapai 5%. Sedangkan di Indonesia prevalensi kelainan bawaan mencapai angka 5 per 1.000 kelahiran. (Effendi, 2006 dalam Neonatologi IDAI 2008). Sekitar 10% dari semua defek saat lahir disebabkan oleh faktor lingkungan, yang disebut teratogen yang mencakup obat-obatan, kimiawi, radiasi, infeksi kongenital serta lingkungan wanita

hamil, serta telah ditemukan bahwa banyak dari bahan-bahan yang umum digunakan seperti kafein adalah membahayakan janin (Curtis, 2000).

Banyak ibu hamil menggunakan obat pada trimester awal kehamilan saat terjadi periode organogenesis, sehingga untuk terjadinya resiko cacat pada janin menjadi lebih besar, sebab obat dapat masuk ke dalam sirkulasi janin (saat di dalam kandungan) sehingga ada peluang untuk terjadinya malformasi atau kelainan fungsi fisiologis yang berpengaruh terhadap perkembangan janin setelah dilahirkan (efek teratogenesis) (Young, 2001).

Teratogen adalah agen yang menyebabkan kecacatan pada janin selama kehamilan. Efek yang ditimbulkan berkaitan dengan jenis, dosis, durasi, dan waktu paparan teratogen tersebut. Obat dapat dikategorikan termasuk agen teratogen (misalnya tetrasiklin). Secara umum bila diperlukan, dosis obat yang digunakan ialah dosis serendah mungkin dan jika mengharuskan terapi obat kombinasi, pemberian terapi sebisa mungkin dihindari pada trimester pertama (Genetic Alliance, 2010).

Kafein merupakan zat yang banyak dikonsumsi dan bila dikonsumsi selama kehamilan, kafein berpotensi untuk mempengaruhi perkembangan fetoplasental (Konje, 2008). Kafein bersifat teratogen tidak spesifik sehingga memungkinkan adanya jenis kecacatan yang ditemukan pada berbagai organ (Santoso *et al.*, 2004). Asupan kafein pada maternal berkaitan dengan penurunan berat badan bayi saat lahir (Konje, 2008). Selain menyebabkan resiko BBLR terhadap ibu hamil, kafein juga dapat menyebabkan malformasi fetal (Santoso *et al.*, 2004).

Malformasi telah dibuktikan pada tikus dengan dosis kafein 80 mg/kg. Pada hewan pengerat, malformasi yang paling sering diamati adalah dari

anggota badan dan rangka, ektrodaktil, malformasi kraniofasial (celah labial dan palatal) serta keterlambatan dalam pembentukan tulang dari tungkai, rahang, tulang belakang dan tulang dada. Ross *et al* juga melaporkan *neural tube defect* terjadi pada embrio yang terpapar oleh kafein. Dan dapat diyakini bahwa konsumsi kafein oleh maternal dapat dengan mudah melewati sawar plasenta, menginduksi vasokonstriksi maternofetal lalu terjadi iskemia sehingga menyebabkan malformasi (Rashidi *et al.*, 2014).

Salah satu efek kafein yaitu dapat mendukung produksi radikal bebas. Pada konsentrasi tinggi, ia akan menyerang asam lemak tidak jenuh ganda dari membran sel, organel sel, atau DNA, sehingga dapat menyebabkan kerusakan struktur dan fungsi sel (Winarsi, 2007). Reaksi radikal bebas ini dapat dilawan dengan pengaruh zat antioksidan. Antioksidan golongan flavonoid adalah antioksidan yang memiliki potensi untuk mencegah pembentukan radikal bebas. Flavonoid diperkirakan hampir 90% sebagai glikosida dan 10% sebagai aglikon (Hernani dan Rahardjo, 2005).

Zat antioksidan banyak ditemukan dalam tanaman sayuran. Brokoli (*Brassica oleracea L.*) adalah tanaman sayuran yang termasuk ke dalam suku kubis-kubisan atau *Brassicaceae*. Brokoli diketahui mengandung air, protein, lemak, karbohidrat, serat, kalsium, zat besi, vitamin (A,C,E, tiamin, riboflavin, nikotinamid), beta karoten, dan glutathione (Dalimartha, 2000). Zat kimia yang terkandung dalam ekstrak brokoli, yang diduga bersifat sebagai antioksidan untuk menangkal radikal bebas adalah flavonoid (Winarsi, 2007). Selain itu, brokoli memiliki kandungan lain seperti asam folat, dimana asam folat berperan dalam sintesis DNA, khususnya diperlukan sebagai koenzim

dalam sintesis pirimidin, dan juga dapat mencegah terjadinya NTD (*neural tube defect*) (Tangkilisan, 2002). Oleh karena itu, brokoli diduga dapat meringankan efek teratogenik (Winarsi, 2007).

Dengan keterkaitan dari semua hal yang telah dipaparkan diatas, kami tertarik untuk mengetahui apakah ekstrak brokoli dapat mencegah terjadinya malformasi pada struktur anatomi vertebra yang disebabkan oleh kafein. Sejauh ini belum ada penelitian mengenai pengaruh ekstrak brokoli terhadap malformasi yang disebabkan oleh kafein. Karena hal tersebut, kami tertarik untuk melakukan penelitian ini dengan hewan uji coba tikus putih strain wistar hamil.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan di atas, rumusan masalah dari penelitian ini yaitu “apakah ekstrak brokoli (*Brassica oleracea* L.) dapat mencegah malformasi pada struktur anatomi vertebra yang disebabkan oleh kafein pada janin tikus selama kehamilan”

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui apakah terdapat pengaruh pada pemberian ekstrak brokoli terhadap malformasi pada struktur anatomi vertebra pada janin tikus yang disebabkan kafein selama kehamilan.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui pengaruh pemberian kafein yang dapat menyebabkan malformasi pada struktur anatomi vertebra pada janin tikus putih strain wistar.

2. Untuk mengetahui pengaruh ekstrak brokoli (*Brassica oleracea L.*) terhadap malformasi pada struktur anatomi vertebra yang disebabkan oleh kafein selama kehamilan.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

1. Memberikan dasar ilmiah untuk penelitian lanjutan tentang pengaruh ekstrak brokoli (*Brassica oleracea L.*) terhadap malformasi pada struktur anatomi vertebra yang disebabkan oleh konsumsi kafein selama kehamilan.
2. Memperkaya khasanah ilmu pengetahuan tentang bahan alami contohnya adalah brokoli (*Brassica oleracea L.*) yang didalamnya terdapat berbagai kandungan zat yang bermanfaat.

1.4.2 Manfaat Praktis

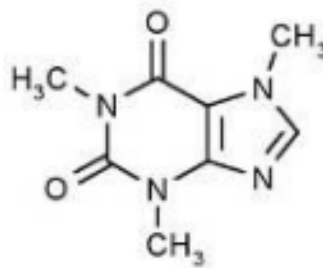
Menjadi masukan kepada masyarakat tentang manfaat bahan alami yang berada di sekeliling kita contohnya adalah brokoli yang termasuk dalam kelompok sayuran, dimana mengandung banyak zat yang berguna bagi kesehatan dan dapat dikembangkan lagi

BAB II

TINJAUAN TEORI

2.1 Kafein

Kafein ditemukan oleh *Freidrich Ferdinand Runge* pada tahun 1820 lalu. Istilah “*kaffein*” yang dibuat olehnya yang memiliki arti suatu senyawa kimia dalam kopi, yang dalam bahasa inggris menjadi “*caffeine*” (Ruzaidi, 2013). Kafein adalah senyawa kimia alkaloid yang terkandung secara alami pada lebih dari 60 jenis tanaman terutama teh (1 – 4,8%), kopi (1 – 1,5%) dan biji kola (2,7 – 3,6%). Kafein diekstraksi dari tanaman tertentu untuk diproduksi secara komersial dan sintesis. Kafein digunakan untuk sebagai penguat rasa atau bumbu dari industri makanan (Misra *et al.*, 2008).



Gambar 2.1 Rumus Bangun Kafein (Ruzaidi, 2013)

2.1.1 Karakteristik Kafein

Menurut definisi kafein berarti senyawa organik yang mengandung nitrogen dengan struktur dua – cincin atau dua – siklik dan kafein termasuk golongan *methylxanthine* yang merupakan sejenis alkaloid heterosiklik. Molekul ini secara alami dalam banyak jenis tanaman sebagai metabolik sekunder. Fungsinya dalam tumbuhan yaitu sebagai pestisida alami yang bisa melumpuhkan dan membunuh serangga yang memakan tumbuhan

tersebut. Zat ini dihasilkan secara eksklusif dalam daun, kacang – kacangan dan buah – buahan lebih dari 60 tanaman, termasuk daun teh biasa (*Camellia sinensis*), kopi (*Coffee arabica*), kacang koko (*Theobroma cacao*), kacang kola (*Cola acuminata*) dan berbagai macam berry (Ruzaidi, 2013)

Rumus kimia untuk kafein adalah $C_8H_{10}N_4O_2$ dan memiliki nama kimia 1, 3, 7 – *trimethylxanthine*. Nama IUPAC untuk kafein adalah 1, 3, 7 – *trimethyl-1H-purine-2,6(3H,7H)-dione*, 3,7 – *dihydro-1,3,7 – trimethyl – 1H-purine-2,6-dione* (Erowid, 2011).

Beberapa sifat fisik kafein :

Berat molekul	: 194,19 g/mol
Densitas	: 1,23 g/cm ³ , solid
Titik Leleh	: 227 – 228°C (<i>anhydrous</i>) 234 – 235°C (<i>monohydrate</i>)
Titik Didih	: 178°C subl.
Kelarutan dalam air	: 2,17 g/ 100 ml (25 °C) 18,0 g/100 ml (80 °C) 67,0 g/100 ml (100 °C)
Keasaman	: -0,13 – 1,22 pKa
Momen dipole	: 3, 64 D
(Mumin <i>et al.</i> , 2006)	

2.1.2 Sumber dan Pemakaian Kafein

Kafein terkandung dalam teh, kopi, minuman coklat, bar coklat, dan minuman ringan. Di Amerika Utara, kopi (60-70%) dan teh (15-30%) merupakan sumber utama kafein dalam diet pada orang dewasa, sedangkan minuman ringan yang mengandung kafein dan coklat merupakan sumber

utama kafein dalam diet anak – anak. Dalam diet orang dewasa di beberapa negara Eropa kopi juga sebagai sumber utama kafein. Kopi tumbuk mengandung kafein terbanyak (56-100 mg/100ml), diikuti oleh kopi dan teh instan (20-73mg /100ml) dan kola (9-19mg/ 100ml). Produk – produk koko dan cokelat juga merupakan sumber kafein yang penting (Nawrot *et al.*, 2002).

2.1.3 Farmakokinetik Kafein

Penyerapan kafein dari saluran pencernaan ke aliran darah sang cepat dan mencapai 99% pada manusia yaitu sekitar 45 menit setelah dikonsumsi kafein. Penyerapan yang tidak sempurna apabila diambil sebagai kopi dengan 90% kafein dalam secangkir kopi akan diserap dalam waktu 20 menit setelah diminum, dengan efeknya bermula dalam satu jam dan bertahan selama 3 hingga 4 jam. Kafein yang diserap akan didistribusikan ke seluruh tubuh. Kafein dapat melewati sawar otak, plasenta ke cairan amnion dan fetus, dan ke susu ibu. Kafein juga pernah dideteksi di dalam semen (Nawrot *et al.*, 2002).

Konsentrasi plasma memuncak setelah 40 hingga 60 menit dengan waktu paruh kira – kira 6 jam (3 sampai 7 jam) pada dewasa sehat. Dan waktu paruhnya berkurang pada individu yang merokok dan meningkatkan hingga 2 kali lipat pada wanita hamil atau yang menggunakan kontrasepsi oral dalam jangka waktu panjang (Lee K-H *et al.*, 2009).

2.1.4 Mekanisme Kerja

Food and Drug Administration (FDA) (1980) mendapatkan kafein dapat melintasi barier otak dan darah serta diperkirakan bahwa janin berkemungkinan tidak memiliki enzim yang diperlukan untuk

mendetoksifikasi diri dari kafein melalui proses yang dikenal sebagai dimetilasi. Kafein dapat melintasi plasenta sehingga meningkatkan laju jantung serta pernapasan janin (Khoury *et al.*, 2006).

Kafein diuraikan dalam hati oleh sistem enzim sitokrom P 450 oksidasi kepada 3 *dimethylxantin* metabolik, yaitu :

- a. *Paraxanthine* (84%), mempunyai efek meningkatkan lipolisis, mendorong pengeluaran gliserol dan asam lemak bebas didalam plasma darah. *Paraxanthine* merupakan metabolit primer dalam kafein yang dapat melewati sawar pasenta dan meraih janin (*Drug Facts Comparison*, 2001). *Paraxanthine* merupakan antagonis reseptor adenosin (A1) pada jantung dan otak maternal-fetal dengan menghambat pengeluaran glutamat pada jaringan perifer, yang dapat memberikan efek merugikan bagi aktivitas metabolik maternal maupun fetal. Pada hewan coba menunjukan paparan kafein selama kehamilan dapat menurunkan reseptor adenosin A1 pada maternal maupun fetal, dimana hal tersebut akan menurunkan peningkatan stimulasi aktivitas tubuh, membuat otak dan jaringan lain mudah terserang oleh efek berbahaya kafein, karena tidak ada lagi penghalang darah menuju otak atau penghalang plasenta terhadap kafein (Jahanfar *et al.*, 2013). *Paraxanthine* merupakan derivat dari *xanthine*, dimana terdapat XO (*xanthine oksidase*) yang merupakan sumber penting OFR (*Oxygene Free Radical*) (Valko *et al.*, 2004).
- b. *Theobromine* (12%) melebarkan pembuluh darah dan meningkatkan volume urin. *Theobromine* merupakan alkaloid utama didalam kokoa (cokelat).

c. *Theophylline* (4%), melonggarkan otot saluran pernafasan, digunakan pada pengobatan asma. Masing-masing dari hasil metabolisme ini akan dimetabolisme lebih lanjut dan akan dikeluarkan melalui urin (*Drug Facts Comparison*, 2001).

Kafein dapat memberikan potensi efek teratogen dari zat – zat lain seperti tembakau, alkohol serta dapat bekerja secara sinergis dengan ergotamine dan propranolol untuk menginduksi terjadinya vasokonstriksi maternofetal yang dapat mengarah ke malformasi karena iskemia (Rashidi *et al.*, 2014).

Menurut hasil sebuah penelitian, kafein dengan dosisi 80mg/kg secara intraperitoneal memberikan efek menurunkan berat, panjang serta meningkatkan kejadian sumbing sebesar 33,3% pada janin. Maternal yang mengkonsumsi kafein dapat memberikan efek pada janinnya. Kafein dengan dosis tinggi dapat menimbulkan efek teratogen pada hewan pengerat (Rashidi *et al.*, 2014).

Pada hewan pengerat, telah diamati malformasi yang paling sering terjadi yaitu malformasi tungkai beserta jumlah jari – jarinya, *ectrodactyly*, malformasi kraniofasial (celah palatum dan labia), terhambatnya pembentukan tulang tungkai, rahang, tulang belakang dan sternum. Kafein berpotensi untuk mengacaukan proses yang terlibat dalam proliferasi sel. Karena telah diketahui bahwa kafein dapat dengan mudah melintasi plasenta dan mencapai janin (Rashidi *et al* 2014).

2.1.5 Efek Jangka Pendek

Kafein dapat memberikan efek jangka pendek di dalam tubuh (jaringan, otak, pembuluh darah dan lainnya). Dalam waktu lima menit

mencapai jaringan dan tahap puncaknya mencapai darah dalam waktu 50 menit, dengan frekuensi pernafasan ; urin, asam lemak dalam darah; asam lambung juga dapat bertambah disertai dengan peningkatan tekanan darah. Dapat pula merangsang otak (dengan dosis 7,5 – 150 mg) dapat meningkatkan aktifitas neural otak dan juga mengurangi kelelahan, dan waktu tidur juga dapat diperlambat oleh kafein (*Drug Facts Comparison*, 2001).

2.1.6 Efek Jangka Panjang

Efek jangka panjang juga dapat ditimbulkan oleh kafein, yaitu dengan pemakaian kafein lebih dari 650 mg dapat menyebabkan insomnia kronik, gelisah dan ulkus. Dapat pula menimbulkan efek lainnya yaitu meningkatkan denyut jantung dan berisiko terhadap penumpukan kolesterol, serta dapat menimbulkan kecacatan pada anak yang dilahirkan (Hoeger, Turner, dan Hafen, 2002).

2.1.7 Metabolisme Kafein Dalam Tubuh Janin

Kafein sangat cepat untuk diabsorpsi oleh sistem pencernaan dan melewati sawar plasenta dengan bebas. Kita ketahui bahwa fetal belum dapat melakukan metabolisme dengan baik. Kafein mengakibatkan peningkatan sirkulasi katekolamin dan menginduksi terjadinya vasokonstriksi uteroplasental serta hipoksia fetal, semuanya dapat memicu gangguan pada pertumbuhan fetal (Jahanfar *et al.*, 2013).

Janin mendapatkan segala yang dibutuhkan melalui aliran darah termasuk gizi dan oksigenasi. Jika terhambat, janin akan kurang mendapatkan semua yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan. Akibatnya, dari penyempitan pembuluh darah ini mungkin

dapat mengakibatkan pertumbuhan terganggu dan dapat terjadi gangguan perkembangan (Michelle, 2011). Kafein dalam kopi selama kehamilan melintasi plasenta dan mencapai bayi, sehingga dapat menurunkan aliran darah ke plasenta, sehingga membahayakan bayi (Weng *et al.*, 2008).

Food and Drugs Administration pada tahun 1980, menemukan bahwa kafein melintasi barier otak dan darah serta diperkirakan bahwa janin mungkin tidak memiliki enzim yang diperlukan untuk mendetoksifikasi diri dari kafein melalui proses yang dikenal sebagai dimetilasi. Kafein bisa melintasi plasenta sehingga meningkatkan laju jantung dan juga pernafasan bayi (Khoury *et al.*, 2006). Konsumsi kafein saat hamil (lebih dari 8 cangkir [er hari) dapat meningkatkan vasokonstriksi uteroplasental, meningkatkan denyut jantung fetal dan aritmia (denyut jantung yang ireguler) dan akhirnya hipoksia fetal (Janhifar *et al.*, 2013).

2.1.8 Kafein Menghasilkan Radikal Bebas

Beberapa efek dari kafein yaitu dapat memicu produksi radikal bebas serta peningkatan stres oksidatif seperti inaktivasi metabolisme katekolamin dan peningkatan metabolisme oksidatif termasuk metabolisme hepatic sendiri. Terdapat laporan yang menunjukkan bahwa kafein memicu kerusakan oksidatif dengan meningkatkan peroksidasi lipid (Rashidi *et al* 2014).

2.1.9 Radikal Bebas

Radikal bebas secara umum merupakan senyawa yang memiliki elektron yang tidak berpasangan dan salah satu bentuk senyawa oksigen yang reaktif. Reaktivitas dari radikal bebas ini sangat tinggi. Hal ini dapat dilihat dari sifatnya yang segera menarik atau menyerang elektron sekelilingnya. Senyawa ini juga bisa mengubah suatu molekul menjadi suatu

radikal. Senyawa ini bentuk oleh berbagai macam faktor dan terbentuk di dalam tubuh (Winarsi, 2007).

Radikal bebas sering dianggap sama dengan oksidan. Melihat kemiripan sifat diantara keduanya yang terletak pada agresivitas untuk menarik elektron di sekelilingnya membuat keduanya dianggap sama. Pemahaman radikal bebas sebagai oksidan memang tidak salah, tetapi perlu diketahui bahwa tidak setiap oksidan merupakan radikal bebas. Radikal bebas lebih berbahaya bila dibandingkan dengan senyawa oksidan non-radikal. Hal ini berhubungan dengan tingginya reaktivitas senyawa radikal bebas itu sendiri, yang mengakibatkan terbentuknya senyawa radikal yang baru (Winarsi, 2007).

Senyawa radikal baru tersebut akan membentuk senyawa baru lagi apabila bertemu dengan molekul lain, dan seterusnya akan seperti itu sehingga terjadi reaksi berantai (*chain reaction*). Reaksi ini akan terus berlanjut dan baru berhenti bila reaktivitasnya direndam (*quenched*) oleh senyawa yang memiliki sifat antioksidan. Akibat yang ditimbulkan akan semakin parah apabila ukuran biomolekul yang mengalami kerusakan semakin besar. Dampak yang negatif akan timbul pada kerusakan sel seperti kerusakan struktur dan fungsinya (Winarsi, 2007).

Secara biologis senyawa biomolekul memiliki fungsi yang sangat penting. Oleh sebab itu, adanya kerusakan struktur dan fungsi sel akan sangat mengganggu sistem kerja organ secara umum. Dalam tubuh terdapat 4 kelompok biomakromolekul yang menyusun sel, yaitu protein, asam nukleat, lemak, dan polisakarida. Molekul – molekul tersebut secara individu maupun bersama – sama mendukung fungsi biologis yang sangat

mendasar. Target utama radikal bebas adalah protein, asam lemak tak jenuh dan lipoprotein, serta unsur DNA termasuk karbohidrat (Winarsi, 2007).

Berbagai kemungkinan dapat terjadi sebagai akibat kerja radikal bebas. Misalnya gangguan fungsi sel, kerusakan struktur sel, molekul termodifikasi yang tidak dapat dikenali oleh sistem imun, dan bahkan mutasi. Karena reaktivitasnya, senyawa radikal bebas akan sesegera mungkin menyerang komponen seluler yang berada di sekitarnya, baik berupa senyawa lipid, lipoprotein, protein, karbohidrat, *ribonucleic acid* (RNA), maupun *deoxyribonucleic acid* (DNA). Akibat lebih jauh dari reaktivitas radikal bebas adalah terjadinya kerusakan struktur maupun fungsi sel (Winarsi, 2007).

2.1.10 Stress Oksidatif

Stres oksidatif merupakan suatu kondisi ketidakseimbangan antara produksi radikal bebas dengan antioksidan, dimana kadar radikal bebas lebih tinggi dibandingkan antioksidan. Kondisi tersebut dipengaruhi oleh faktor internal seperti genetik, umur, oksidasi fosforilasi, proses patofisiologi, dan faktor eksternal seperti olahraga berlebih, asupan makanan, patogen, sinar ultraviolet, dan bahan kimia (Arsana, 2014).

Pada kondisi stres oksidatif ini, imbang normal antara produksi radikal bebas atau senyawa oksigen reaktif dengan kemampuan antioksidan alami tubuh untuk mengeliminasinya mengalami gangguan sehingga menggoyahkan rantai reduksi-oksidasi normal, sehingga menyebabkan kerusakan oksidatif jaringan. Kerusakan jaringan ini juga tergantung pada beberapa faktor, antara lain: target molekuler, tingkat stres yang terjadi, mekanisme yang terlibat, serta waktu dan sifat alami dari sistem yang

diserang. Oleh karena itu tubuh memerlukan suatu substansi penting yaitu antioksidan yang mampu menangkap radikal bebas tersebut sehingga tidak dapat menginduksi suatu penyakit (Kikuzaki *et al.*, 2002 dan Halliwell, 2000).

Istilah stres oksidatif juga didefinisikan sebagai suatu keadaan dimana terjadi peningkatan level ROS. Dalam jumlah normal, ROS berperan dalam proses fisiologis seperti sistem pertahanan tubuh, biosintesis hormon, fertilisasi, dan sinyal seluler. Akan tetapi, peningkatan produksi ROS yang dikenal dengan kondisi stres oksidatif memiliki implikasi pada berbagai macam penyakit seperti hipertensi, aterosklerosis, diabetes, gagal jantung, stroke, dan penyakit kronis lainnya. Peningkatan ROS tersebut dapat terjadi sebagai akibat dari metabolisme oksigen, reperfusi oksigen saat kondisi hipoksia, oksidasi hemoglobin dan mioglobin, dan lain-lain (Puspitasari, 2016).

ROS dapat memicu peroksidasi terhadap lipid. Peroksidasi lipid tidak saja bertanggung jawab atas kerusakan makanan, tetapi lebih penting adalah kerusakan jaringan tubuh *in vivo*. Peroksidasi terhadap lipid dalam membran sel akan sangat mengganggu fungsi membran, menimbulkan kerusakan yang *irreversible* terhadap fluiditas dan elastisitas membran yang dapat menyebabkan ruptur membran sel. Salah satu produk akhir dari peroksidasi lipid adalah *malondyaldehyde* (MDA) (Puspitasari, 2016).

MDA terbentuk dari peroksidasi lipid pada membran sel yaitu reaksi radikal bebas (radikal hidroksil) dengan *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA). Reaksi tersebut terjadi secara berantai, akibat dari akhir reaksi tersebut akan terbentuk hidrogen peroksida. Lipid hidroperoksida dapat terurai dan dikatalis oleh logam transisi menghasilkan senyawa karbonil rantai pendek

seperti aldehida dan keton yang bersifat sitotoksik. Pemecahan ikatan karbon selama peroksidasi lipid menyebabkan pembentukan alkanal seperti MDA (Puspitasari, 2016).

2.1.11 Kerusakan DNA

Protein, lemak membran, karbohidrat, dan asam nukleat dapat menjadi sasaran kerusakan akibat radikal oksigen. Kerusakan radikal bebas ini diperkirakan berperan menimbulkan penyulit pada banyak penyakit. Pada protein, asam amino prolin, histidin, arginin, sistein, dan metionin terutama rentan terhadap serangan radikal hidroksil dan kerusakan oksidatif. Oksidasi asam amino dalam protein menimbulkan fragmentasi protein, pembentukan ikatan-silang dan agregasi, dan kerentanan terhadap digesti proteolitik (Marks *et al.*, 2000).

Peroksidasi molekul lemak selalu mengubah atau merusak struktur molekul lemak. Selain sifat peroksidasi lemak membran yang secara alami menghancurkan dirinya sendiri, aldehida yang terbentuk dapat menimbulkan ikatan-silang pada protein. Apabila lemak yang rusak adalah konstituen suatu membran biologis, susunan lapis-ganda lemak yang kohesif dan organisasi struktural akan terganggu. Radikal bebas tanpa-oksigen juga merupakan sumber utama kerusakan DNA. Saat ini telah diketahui sekitar 20 jenis molekul DNA yang mengalami gangguan oksidatif. Peningkatan nonspesifik Fe^{2+} ke DNA mempermudah terbentuknya radikal hidroksil lokal setempat, yang dapat menyebabkan pemutusan untai dan perubahan basa DNA (Marks *et al.*, 2000).

Kerusakan langsung DNA oleh radikal bebas merupakan fokus utama terjadinya malformasi kongenital. Spesies radikal reaktif juga dapat

menyebabkan kerusakan komponen seluler lainnya. Fosfolipid pada membran sel sangat sensitif terhadap oksidasi dan telah ditemukan sering terjadi kerusakan oleh adanya radikal bebas yang memungkinkan fosfolipid membran sel tersebut berpartisipasi dalam reaksi berantai radikal bebas. Banyak asam lemak tak jenuh ganda yang berisi kelompok metilen yang membuat asam lemak lebih sensitif terhadap oksidasi. Konsentrasi tinggi asam lemak tak jenuh ganda dalam fosfolipid memungkinkan asam lemak tersebut ikut berpartisipasi dalam reaksi berantai radikal bebas. Asam lemak yang paling umum dalam sel adalah asam linoleat. Produk awal oksidasi asam lemak tak jenuh yaitu lipid hidoperoksida. Ketika bereaksi dengan logam maka akan menghasilkan sejumlah produk (misal aldehida dan epoksida) yang reaktif (Valko *et al.*, 2004).

MDA adalah salah satu dari aldehida utama produk peroksidasi lipid. Dan bersifat mutagenik pada sel mamalia. MDA dapat bereaksi dengan basa DNA dG, dA, dan dC. ROS sangat potensial dalam berinteraksi dengan komponen seluler yang mengandung basa DNA atau tulang punggung deoxyribosa DNA untuk menghasilkan kerusakan pada basa atau rantai DNA (Valko *et al.*, 2004).

Radikal bebas mendorong adanya perubahan genetik, seperti terjadinya mutasi dan penyusunan ulang kromosom. Akibat dari DNA oksidatif yaitu dapat menghasilkan kelainan kromosom, hambatan replikasi DNA dan sitotoksitas. Mutasi DNA juga dapat terjadi akibat proses replikasi yang salah (Valko *et al.*, 2004).

2.2 Brokoli (*Brassica oleracea* L.)

Brokoli merupakan tanaman sayuran yang masuk ke dalam suku kubis – kubisan (*Brassicaceae*). Brokoli terdapat tiga tipe yang ditanam, yaitu tipe umur genjah, tipe umur sedang, dan tipe umur dalam. Bagian tanaman ini yang dapat dimakan adalah perbungaan yang terdiri atas bunga muda yang telah terdiferensiasi sempurna dan bagian atas batang yang lembut (Herbarium Medanense, 2012).

Brokoli termasuk tanaman sayuran yang tidak tahan panas dan termasuk dalam keluarga kubis – kubisan. Karenanya brokoli cocok untuk ditanam di dataran tinggi yang lembab dengan suhu rendah, yaitu diatas 700 mdpl. Daun dan sifat pertumbuhan brokoli mirip dengan bunga kubis, bedanya bunga brokoli berwarna hijau dan masa tumbuhnya lebih lama dari kubis bunga. Brokoli tersusun dari bunga – bunga (Rubatzky dan Yamaguchi, 1998).

2.2.1 Klasifikasi Brokoli

Genus *Brassica* (keluarga *Brassicaceae* atau *Cruciferae*) merupakan sumber yang kaya akan senyawa kesehatan yang mempengaruhi dan secara luas dianggap makanan pokok dan ideal untuk penelitian ilmu tanaman.

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Divisi	: <i>Spermathophyta</i>
Kelas	: <i>Dicotyledone</i>
Ordo	: <i>Capparales</i>
Famili	: <i>Brassicaceae</i>

Genus : *Brassica*
Spesies : *Brassica oleracea L.*

(Herbarium Medanense, 2012)

2.2.2 Kandungan Kimia Brokoli

Brokoli merupakan sayuran yang kaya akan nutrisi. Makin hijau warna brokoli tersebut maka makin baik kandungan nutrisi yang dapat diperoleh. Brokoli merupakan sayuran yang kaya akan nutrisi dan mikronutrien diantaranya adalah protein, vitamin A, B6, C, D, E, K, thiamin, riboflavin, niasin, folat, dan beberapa mikronutrien lainnya (Lie, 2010).

2.2.3 Kandungan Vitamin A Pada Brokoli

Karoten yang dikenal sebagai prekursor vitamin A (beta karoten), saat ini telah dikembangkan sebagai efek protektif melawan sel kanker, penyakit jantung, mengurangi penyakit mata, antioksidan, dan regulator dalam sistem imun tubuh manusia (Jones *et al.*, 2007). Dalam 100 gram brokoli terdapat vitamin A sekitar 1542 IU sehingga dengan mengonsumsi brokoli akan dapat membantu terhindar dari penyakit yang disebabkan oleh kekurangan vitamin A (Nugraha, 2010). Untuk aktivitas antioksidan dari karotenoid timbul sebagai akibat dari kemampuan terkonjugasinya struktur ikatan ganda untuk delokalisasi elektron yang tidak berpasangan (Valko *et al.*, 2004).

2.2.4 Kandungan Vitamin C Pada Brokoli

Brokoli dapat dikonsumsi mentah, direbus, atau untuk disup. Brokoli mengandung vitamin B, vitamin C, asam folat, dan beta karoten yang tinggi. Selain itu, brokoli juga mengandung beberapa mineral, seperti kalsium, zat besi, fosfor, potassium dan sulfur (Bangun, 2012).

Brokoli (*Brassica oleracea L. var italica*) mengandung fitokimia yang baik seperti glukosinolat, senyawa fenolik. Serat dan senyawa antioksidan seperti vitamin C dan E serta mineral (Moreno *et al.*, 2006). Bila dibandingkan dengan sayuran lainnya, pada brokoli memiliki kandungan vitamin C dan serat yang lebih tinggi yaitu sebesar 89,2 mg dan 2,6 mg (USDA, 2012).

2.2.5 Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron (*electron donor*) atau reduktan. Senyawa ini memiliki berat molekul kecil, tetapi mampu menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi, dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif. Akibatnya, kerusakan sel akan dihambat. Berkaitan dengan reaksi oksidasi dalam tubuh, status antioksidan merupakan parameter penting untuk memantau kesehatan seseorang (Winarsi, 2007).

Tubuh manusia memiliki sistem antioksidan untuk menangkal reaktivitas radikal bebas, yang secara kontinu dibentuk sendiri oleh tubuh. Bila jumlah senyawa oksigen reaktif ini melebihi jumlah antioksidan dalam tubuh, kelebihannya akan menyerang komponen lipid, protein, maupun DNA sehingga mengakibatkan kerusakan – kerusakan yang disebut stres oksidatif. Antioksidan dapat berupa enzim (misalnya superoksida dismutase atau SOD, katalase, dan glutathione peroksidase), vitamin (misalnya vitamin E, C, A, dan β -karoten), dan senyawa lain (misalnya flavonoid, albumin, bilirubin, seruloplasmin, dan lain – lain) (Winarsi, 2007).

Antioksidan enzimatis merupakan sistem pertahanan utama (primer) terhadap kondisi stres oksidatif. Enzim – enzim tersebut merupakan

metaloenzim yang aktivitasnya sangat tergantung pada adanya ion logam. Antioksidan enzimatis bekerja dengan cara mencegah terbentuknya senyawa radikal bebas baru (Winarsi, 2007).

Di samping antioksidan yang berisfat enzimatis, ada juga antioksidan non-enzimatis yang dapat berupa senyawa nutrisi maupun non-nutrisi. Kedua kelompok antioksidan non-enzimatis ini disebut juga antioksidan sekunder karena dapat diperoleh dari asupan bahan makanan, seperti vitamin C, E, A, dan β -karoten. Glutation, asam urat, bilirubin, albumin, dan flavonoid juga termasuk dalam kelompok ini. Senyawa – senyawa itu berfungsi menangkap senyawa oksidan serta mencegah terjadinya reaksi berantai. Komponen – komponen tersebut tidak kalah penting perannya dalam menginduksi status antioksidan tubuh. Misalnya isoflavon, salah satu komponen flavonoid. Senyawa ini telah banyak dilaporkan sebagai antioksidan. Antioksidan non-enzimatis banyak ditemukan dalam sayuran maupun buah – buahan, biji – bijian, serta kacang – kacangan (Winarsi, 2007).

2.2.6 Flavonoid

Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa metabolit sekunder yang paling banyak ditemukan di dalam jaringan tanaman. Flavonoid termasuk dalam golongan senyawa phenolik dengan struktur kimia C₆-C₃-C₆. Kerangka flavonoid terdiri atas satu cincin aromatik A, satu cincin aromatik B, dan cincin tengah berupa heterosiklik yang mengandung oksigen dan bentuk teroksidasi cincin ini dijadikan dasar pembagian flavonoid ke dalam sub – sub kelompoknya. Sistem penomoran digunakan untuk membedakan posisi karbon di sekitar molekulnya (Redha, 2010)..

Berbagai jenis senyawa, kandungan dan aktivitas antioksidatif flavonoid sebagai salah satu kelompok antioksidan alami yang terdapat pada sereal, sayur – sayuran dan buah, telah banyak dipublikasikan. Flavonoid berperan sebagai antioksidan dengan cara mendonasikan atom hidrogennya atau melalui kemampuannya mengkelat logam, berada dalam bentuk glukosida (mengandung rantai samping glukosa) atau dalam bentuk bebas yang disebut aglikon (Redha, 2010).

Flavonoid banyak dijumpai dalam bentuk aglikon (tanpa terikat gula) dan glikosida. Aglikon flavonoid merupakan polifenol yang mempunyai sifat kimia senyawa fenol, yang bersifat agak asam sehingga dapat larut dalam basa. Tetapi jika dibiarkan dalam larutan basa dan terdapat oksigen akan banyak terurai (Jannah, 2016).

Flavonoid mempunyai sejumlah gugus hidroksil yang tak tersulih, atau gula, dan bersifat polar, sehingga pada umumnya flavonoid cukup larut dalam pelarut polar seperti air, etanol (*EtOH*), metanol (*MeOH*), butanol (*BuOH*), aseton, dimetilsulfoksida (*DMSO*), dimetilformamida (*DMF*), dan lain – lain. Glikosida merupakan gula terikat pada flavonoid (bentuk yang umum ditemukan) cenderung menyebabkan flavonoid lebih mudah larut dalam air dan campuran pelarut diatas dengan air merupakan pelarut yang lebih baik untuk glikosida. Sebaliknya aglikon yang kurang polar seperti isoflavon, flavanon, dan flavon serta flavonol yang termetoksilasi cenderung lebih mudah larut dalam pelarut seperti eter dan kloroform (Jannah, 2016).

Antioksidan golongan flavonoid adalah antioksidan yang memiliki potensi untuk mencegah pembentukan radikal bebas. Flavonoid diperkirakan

hampir 90% sebagai glikosida dan 10% sebagai aglikon (Hernani dan Rahardjo, 2005).

Golongan flavonoid memiliki aktivitas antioksidan meliputi flavon, flavonol, isoflavon dan kalkon. Senyawa flavonoid secara in vitro telah terbukti merupakan inhibitor yang kuat pada lipid peroksidasi, menangkap senyawa oksigen atau nitrogen (ROS atau RNS), menghambat kerusakan hem protein dan pengikatan ion logam. Kekuatan aktivitas antioksidan dari flavonoid bergantung pada jumlah dan posisi dari gugus OH yang terdapat pada molekul. Semakin banyak substitusi gugus hidroksi pada flavonoid, maka aktivitas antiradikalnya semakin besar (Puspitasari, 2016).

Flavonoid merupakan senyawa yang banyak terkandung di dalam brokoli yang dipercaya berfungsi sebagai antioksidan. Mengonsumsi makanan yang mengandung antioksidan tinggi dapat mengurangi resiko terkena kanker. Aktivitas antioksidan selain dapat mencegah proses autooksidasi yang menghasilkan radikal bebas juga dapat menekan proliferasi sel kanker (Kurniasih, 2011).

2.2.7 Manfaat

Brokoli termasuk dalam golongan *Cruciferae*, masih banyak lagi tumbuhan yang termasuk dalam famili tersebut, seperti brokoli, kembang kol, kohlrabi, kubis, dan beberapa jenis yang lain. Menurut hasil penelitian golongan *Cruciferae* ini mempunyai efek proteksi terhadap penyakit keganasan karena senyawa glukosinolat yang terkandung di dalamnya. Glukosinolat (β -thioglycoside-N-hydroxysulfates) di hidrolisis oleh enzim mirosinase yang terdapat di dalam tumbuhan. Pada brokoli, glukosinolat yang utama adalah glukoraphanin. Hasil pemecahan glukoraphanin adalah

sulforaphane, yang memicu produksi enzim fase II, yang termasuk dalam enzim fase II yaitu, *glutathion S-transferase (GST)*, *sulfotransferase*, *N-acetyl-transferase*. Enzim tersebut mempunyai aktivitas antikanker, dan mempunyai efek sebagai antioksidan serta berperan dalam menekan reaksi inflamasi (Lie, 2010).

2.3 Periode Embrionik

Embriogenesis merupakan suatu proses pembelahan sel dan diferensiasi sel dari embrio manusia yang terjadi pada saat tahap - tahap awal dari perkembangan manusia. Embriogenesis terjadi bila spermatozoa bertemu dan menyatu dengan ovum yang disebut fertilisasi sampai pada akhir dari minggu ke-8 perkembangan manusia (Sadler, 2009).

Embriogenesis melewati beberapa tahapan yaitu fertilisasi, yakni suatu proses penyatuan gamet pria (spermatozoa) dan wanita (ovum) di ampulla tuba falopii. Sebelum spermatozoa dapat membuahi oosit, mereka harus mengalami proses kapasitasi dan reaksi akrosom (Sadler, 2009).

Kapasitasi merupakan masa penyesuaian di dalam saluran reproduksi wanita, pada manusia berlangsung sekitar 7 jam. Selama waktu ini, suatu selubung glikoprotein dari protein – protein plasma segem dibuang dari selaput plasma, yang membungkus daerah akrosom spermatozoa. Hanya sperma yang menjalani kapasitasi yang dapat melewati sel korona dan mengalami reaksi akrosom (Sadler, 2009).

Reaksi akrosom terjadi setelah penempelan ke zona pelusida dan diinduksi oleh protein – protein zona. Reaksi ini berpuncak pada pelepasan enzim – enzim yang diperlukan untuk menembus zona pelusida, antara lain akrosin dan zat – zat serupa tripsin. Fase fertilisasi ini meliputi 3 fase yaitu :

1. Penembusan korona radiata

Dari sekian ratusan juta spermatozoa yang masuk saluran genitalia wanita, hanya 300 sampai 500 yang mencapai tempat pembuahan. Sperma yang berjumlah 300 – 500 hanya salah satunya yang dapat membuahi ovum. Diperkirakan spermatozoa – spermatozoa yang lain membantu satu sperma ini untuk menembus sawar pelindung gamet wanita. Sperma yang telah melalui kapasitasi tidak akan sulit untuk menembus korona radiata (Sadler, 2009).

2. Penembusan zona pelusida

Zona pelusida merupakan sebuah selubung glikoprotein yang mengelilingi ovum yang mempertahankan pengikatan sperma dan menginduksi reaksi kromosom. Pengikatan maupun reaksi akrosom diperantai oleh ligan ZP3, suatu protein zona pelusida. Saat spermatozoa masuk ke dalam membran oosit, spermatozoa lain tidak akan bisa masuk lagi karena aktivasi dari enzim oosit sendiri (Sadler, 2009).

3. Fusi membran sel sperma dan oosit

Spermatozoa bergerak masuk ke membran oosit dan mencapai inti oosit. Spermatozoa dan oosit masing – masing memiliki 23 kromosom (haploid), selama masa penyatuan masing – masing pronukleus melakukan sintesis DNA. Bila tidak mensintesis DNA, masing – masing dari sel zigot dua-sel hanya memiliki separuh dari jumlah normal DNA. Segera setelah sintesis DNA, kromosom tersusun dalam gelendong untuk melakukan pembelahan secara mitosis yang normal. Dua puluh tiga kromosom dari maternal dan dua puluh tiga kromosom dari paternal membelah sepanjang sentromer, dan kromatid – kromatid yang berpasangan tersebut saling

bergerak ke kutub yang berlawanan, sehingga menyiapkan sel zigot yang masing – masing mempunyai jumlah kromosom dan DNA diploid (Sadler, 2009).

Setelah zigot mengalami pembelahan dan menjadi tingkat dua sel, ia akan menjalani serangkaian pembelahan mitosis yang mengakibatkan bertambahnya jumlah sel dengan cepat. Sel ini dikenal sebagai blastomer yang akan berkumpul secara longgar membentuk gumpalan saat mencapai stadium delapan-sel. Tetapi, setelah pembelahan ketiga, blastomer memaksimalkan kontak satu sama lain, dan membentuk suatu bola sel padat. Kira – kira setelah 3 hari pembuahan, sel – sel embrio yang termampatkan tersebut, membelah lagi membentuk morula 16-sel. Sel – sel bagian dari morula merupakan massa sel dalam, sedangkan sel – sel di sekitar membentuk massa sel luar. Massa sel dalam akan membentuk jaringan – jaringan embrio yang sebenarnya, sementara massa sel luar akan membentuk trofoblas yang kemudian ikut membentuk plasenta (Sadler, 2009).

Pada saat morula memasuki rongga uterus, cairan mulai merembes dan menembus zona pelusida ke dalam ruang antarsel massa sel dalam. Ruang antarsel secara bertahap menjadi konfluen dan akhirnya terbentuk sebuah rongga yang disebut blastokel. Pada masa ini embrio disebut blastokista. Sel – sel di massa sel dalam yang sekarang disebut embroblas, terletak di satu kutub, dan sel – sel di massa sel luar, atau trofoblas, menggepeng dan membentuk dinding epitel blastokista. Zona pelusida telah lenyap sehingga implantasi dapat dimulai (Sadler, 2009).

Periode embrionik dimulai pada permulaan minggu ketiga setelah ovulasi dan fertilisasi, yang terjadi bersamaan dengan perkiraan permulaan periode menstruasi berikutnya (Cunningham *et al.*, 2014). Periode embrionik berlangsung selama 8 minggu dan merupakan saat terjadinya organogenesis. Selama minggu ketiga hingga kedepalan merupakan waktu dari masing – masing dari ketiga lapisan germinativum yaitu, ektoderm, mesoderm, dan endoderm, menghasilkan sejumlah jaringan dan organ yang spesifik (Sadler, 2009).

Pada awal minggu ketiga, lapisan germinativum ektoderm memiliki bentuk seperti cakram yang lebih besar di bagian sefalik daripada kaudal. Kemunculan notokord dan mesoderm prekordal menginduksi ektoderm di atasnya untuk menebal dan membentuk lempeng saraf (neural plate). Sel – sel lempeng saraf ini membentuk neuroektoderm, dan induksinya mencerminkan proses awal neurulasi. Lapisan germinativum ektoderm membentuk organ dan struktur – struktu yang mempertahankan kontak dengan dunia luar: (a) susuna saraf pusat; (b) sistem saraf tepi; (c) epitel sensorik telinga, hidung dan mata; (d) kulit, termasuk rambut dan kuku; dan (e) kelenjar hipofisis, kelenjar *mammae*, dan kelenjar keringat serta email gigi (Sadler, 2009).

Pada sel – sel lapisan germinativum mesoderm awalnya membentuk suatu lembaran tipis anyaman jaringan yang longgar di kedua sisi garis tengah. Namun, pada hari ke-17, sel – sel yang terletak dekat dengan garis tengah berproliferasi dan membentuk suatu lempeng jaringan tebal yang dikenal sebagai mesoderm paraksial. Awal minggu ketiga, mesoderm paraksial mulai tersusun membentuk segmen – segmen. Segmen ini dikenal

sebagai somitomer, mulanya muncul di bagian kepala embrio lalu terus membentuk dengan arah sefalokaudal. Pada daerah oksipital ke kaudal, somitomer tersusun menjadi somit – somit . Somit membentuk miotom (jaringan otot), skeleton (tulang rawan dan sejati, dan dermatom (jaringan subkutan kulit), yang semuanya merupakan jaringan penunjang tubuh (Sadler, 2009).

Pasangan pertama somit timbul sekitar pada hari ke-20 di bagian oksipital embrio. Setelah itu somit – somit baru muncul berurutan dari kranial ke kaudal dengan kecepatan tiga pasang somit per hari, sampai pada akhir minggu ke lima, terdapat 42 – 44 pasang somit yang tersusun atas somit oksipital (4 pasang), servikal (8 pasang), torakal (12 pasang), lumbal (5 pasang), sakral (5 pasang), dan koksigeal (8 – 10 pasang). Somit oksipital pertama dan lima sampai tujuh somit koksigeal terakhir kemudian lenyap, sedangkan sisanya akan membentuk kerangka sumbu badan (Sadler, 2009).

Pembentukan somit bersegmen dari mesoderm presomit (paraksial) nonsegmental bergantung pada segementation clock yang dibentuk oleh “gen – gen siklik”. Gen – gen siklik tersebut mencakup anggota jalur sinyal *Notch* dan *WNT* yang diekspresikan dalam pola osilasi di mesoderm presomit. Sebaliknya, sinyal – sinyal ini secara berkala mengaktifkan gen – gen pembentukan pola segmen yang mengatur pembentukan somit. Batas untuk ekspresi gen – gen penentu pola somit di dalam regio pembentuk – somit mesoderm presomit diatur oleh asam retinoat (*RA*) dan *FGF8*. *RA* diekspresikan dalam suatu gradien retrokaudal, sedangkan *FGF8* diekspresikan dalam gradien kaudorostral, sedemikian sehingga *RA* meningkatkan gen – gen penentu pola somit sementara *FGF8* menekan

aktivitas *RA* dan menghambat pematangan mesoderm presomit menjadi somit (Sadler, 2009).

Pada awal minggu keempat, sel – sel yang memebentuk dinding ventral dan medial somit kehilangan susunannya yang kompak, menjadi polimorf, dan bergeser posisinya untuk mengelilingi notokord. Sel – sel ini, yang secara kolektif dikenal sebagai sklerotom, membentuk anyaman jaringan yang longgar, mesenkim. Sebagian dari sel – sel ini membentuk tendon, sedangkan sisanya mengelilingi korda spinalis dan notokord untuk membentuk kolumna vertebralis (Sadler, 2009).

Pada regulasi molekular deferensiasi somit, sinyal untuk diferensiasi somit berasal dari struktur di sekitarnya, termasuk notokord, tabung saraf, epidermis, dan mesoderm lempeng lateral. Produk protein yang diseksresikan dari gen *noggin* dan *sonic hedgehod (SHH)* yang dihasilkan oleh notokord dan lempeng lantai tabung saraf, menginduksi bagian ventromedial somit untuk menjadi sklerotom. Setelah terinduksi, sel – sel sklerotom mengekspresikan faktor transkripsi *PAX1* yang memulai rangkaian gen pembentuk tulang rawan dan tulang untuk membentuk vertebra (Sadler, 2009).

Mesoderm juga membentuk sistem pembuluh, yaitu jantung, pembuluh nadi, pembuluh getah bening, dan semua sel darah dan sel getah bening. Di samping itu, lapisan mesoderm membentuk sistem urinaria; ginjal, gonad, dan saluran – salurannya (tetapi tidak termasuk kandung kemih). Akhirnya limpa dan korteks adrenal juga merupakan turunan dari mesoderm (Sadler, 2009).

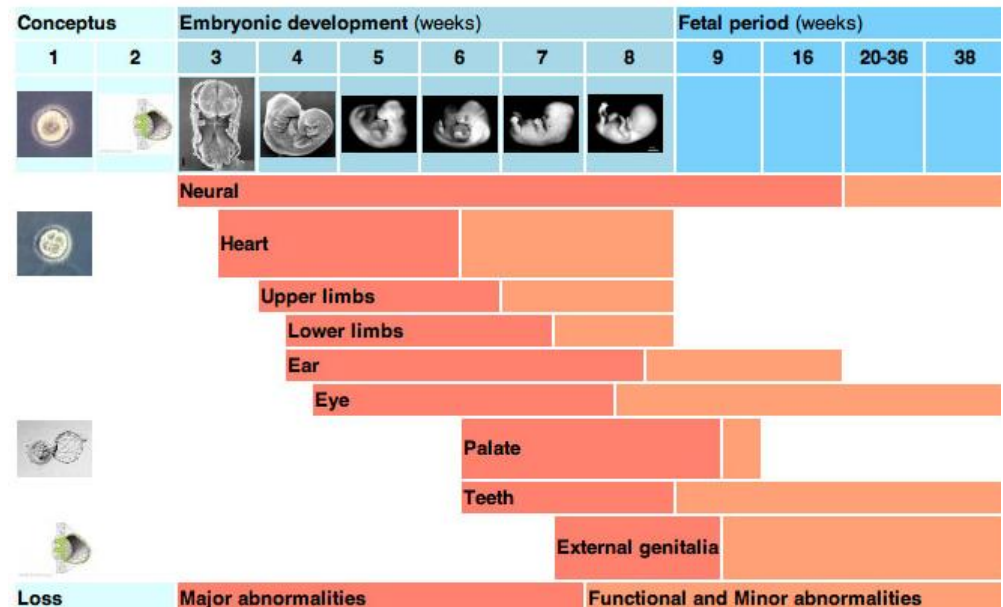
Lapisan endoderm menghasilkan epitel saluran pencernaan, saluran pernafasan dan kandung kemih. Lapisan ini juga membentuk parenkim tiroid, paratiroid, hati dan kelenjar pankreas. Akhirnya, lapisan epitel kavum timpani dan tuba eustachius juga berasal dari endoderm (Sadler, 2009).

Pada periode embrionik ini, body stalk telah berdiferensiasi, dan sakus korionik berdiameter sekitar 1 cm. Terdapat ruang intervilus sejati yang mengandung darah maternal, dan inti vilus yang mengandung mesoderm korionik angioblastik. Selama minggu keempat, sistem kardiovaskular telah terbentuk sehingga terbentuklah sirkulasi sejati dalam embrio, serta antara embrio dan vili korionik. Pada akhir minggu keempat, sakus korionik berdiameter 2 hingga 3 mm, dan embrio memiliki panjang 4 – 5 mm. Pembentukan sekat dalam jantung primitif dimulai pada pertengahan minggu keempat. Bakal lengan dan tungkai telah terbentuk, dan selubung amnion mulai terlepas dari body stalk, yang selanjutnya menjadi tali pusat (Cunningham *et al.*, 2014).

Pada akhir minggu keenam, embrio memiliki panjang 22 hingga 24 mm, serta kepala berukuran relatif besar dibandingkan badan. Jantung telah terbentuk sempurna, jari – jari tangan dan kaki telah ditemukan, dan lengan menekuk pada siku. Bibir atas telah sempurna, dan telinga luar membentuk peninggian definitif pada masing – masing sisi kepala (Cunningham *et al.*, 2014).

Menjelang masa akhir embrionik ini, sistem – sistem organ telah terbentuk. Karena pembentukan organ ini, bentuk janin banyak berubah dan ciri – ciri utama bentuk tubuh bagian luar sudah dapat dikenali menjelang bulan kedua. Masa janin berlangsung dari perkembangan minggu keempat

hingga kedelapan dan merupakan masa terbentuk jaringan dan sistem organ dari masing – masing lapisan janin. Sebagai akibat pembentukan organ, ciri – ciri utama bentuk tubuh mulai jelas (Sadler, 2009).



Gambar 2.2 Human Critical Period of Development (Hill, M.A, 2016)

2.3.1 Malformasi

Kelainan kongenital atau bawaan adalah kelainan yang sudah ada sejak lahir yang dapat disebabkan oleh faktor genetik maupun non genetik. Namun, berdasarkan patogenesisnya kelaianan kongenital dibedakan menjadi empat yaitu malformasi, deformitas, disrupsi dan diplasia. Malformasi adalah suatu proses kelainan yang disebabkan oleh kegagalan atau ketidaksempurnaan dari satu atau lebih proses embriogenesis. Perkembangan awal dari suatu jaringan atau organ tersebut berhenti, melambat atau menyimpang sehingga menyebabkan terjadinya suatu kelainan struktur yang menetap. Kelainan ini mungkin terbatas hanya pada

satu daerah anatomi, mengenai seluruh organ, atau mengenai berbagai sistem tubuh yang berbeda (Effendi, 2006 dalam Nenonatologi IDAI 2008).

Zat kimia yang secara nyata mempengaruhi perkembangan janin menimbulkan efek yang berubah – ubah mulai dari kematian sampai kelainan bentuk (malformasi) dan hambatan pertumbuhan (Young, 2011). Terjadinya suatu cacat lahir pada neonatus yang semasa janin pernah terpajan obat – obatan, bahan kimia, atau agen lingkungan tertentu, menimbulkan kekhawatiran bahwa agen tersebut bersifat teratogen (Cunningham *et al.*, 2014).

2.3.2 Malformasi Struktur Anatomi Vertebra

Proses pembentukan dan penataan-ulang sklerotom – sklerotom segmental menjadi vertebrae definitif merupakan proses yang rumit, dan cukup sering terjadi penyatuan asimetris antara dua vertebra yang berdekatan atau hilangnya separuh dari satu vertebra yang menjadi salah satu penyebab pembengkokan tulang belakang ke lateral. Jumlah vertebra juga lebih sering lebih atau kurang daripada normal (Sadler, 2009).

Pada orang dengan jumlah vertebrae yang lebih sedikit daripada normal, dan vertebrae yang ada sering menyatu atau berbentuk abnormal. Anomali – anomali ini biasanya berkaitan dengan cacat lain. Salah satu cacat vertebra yang paling serius terjadi karena penyatuan tak sempurna atau tidak menyatunya arkus – arkus vertebrae. Kelainan ini dapat mengenai hanya arkus vertebrae tulang tanpa melibatkan korda spinalis. Pada kejadian ini, cacat tulang tertutupi oleh kulit dan tidak terjadi defisit neurologis. Kelainan yang lebih parah ialah tabung saraf yang gagal menutup, arkus vertebrae yang tidak terbentuk, dan jaringan saraf menjadi terpajan. Semua

defisit neurologis bergantung pada ketinggian dan luas lesi. Kecacatan ini terjadi pada 1 per 1000 kelahiran (Sadler, 2009).

2.3.3 Embriologi Vertebra

Sistem rangka berkembang dari mesoderm paraksial dan lempeng lateral (lapisan somatik) dan dari krista neuralis. Mesoderm paraksial membentuk serangkaian blok jaringan tersegmentasi di kedua sisi tabung saraf yang dikenal sebagai somitomer di regio kepala dan somit dari regio oksipital ke kaudal. Somit berdiferensiasi menjadi bagian ventromedial, sklerotom, dan bagian dorsolateral, dermomyotom. Pada akhir minggu keempat, sel – sel sklerotom menjadi polimorfik dan membentuk jaringan yang terjalin longgar, mesenkim, atau jaringan ikat embrio. Sel mesenkim memiliki ciri dapat bermigrasi dan berdiferensiasi melalui banyak cara. Sel – sel ini dapat menjadi fibroblas, kondroblas, atau osteoblas (sel pembentuk tulang) (Sadler, 2009).

Vertebra terbentuk dari bagian sklerotom somit yang berasal dari mesoderm paraksial. Vertebra tipikal terdiri dari arkus vertebrae dan foramen vertebra (tempat lewatnya korda spinalis), korpus, prosesus transversus, dan biasanya prosesus spinosus. Selama minggu keempat, sel – sel sklerotom bermigrasi ke sekeliling korda spinalis dan notokord untuk menyatu dengan sel – sel dari somit yang berlawanan di sisi lain tabung saraf. Siring dengan berlanjutnya perkembangan, bagian sklerotom dari masing – masing somit juga mengalami suatu proses yang disebut resegmentasi (Sadler, 2009).

Resegmentasi terjadi ketika separuh kaudal dari masing – masing sklerotom tumbuh ke dalam dan menyatu dengan separuh sefalik dari masing – masing sklerotom di bawahnya. Karena itu, setiap vertebra

dibentuk oleh kombinasi separuh kaudal satu somit dan separuh kranial somit di dekatnya. Pembentukan pola berbagai vertebra diatur oleh gen – gen HOX (*Homeobox gene*)(Sadler, 2009).

Sel – sel mesenkim di antara bagian sefalik dan kaudal segmen sklerotom asli tidak berproliferasi tetapi mengisi ruang antara dua korpus vertebrae prekartilaginosa. Dengan cara ini, sel –sel tersebut ikut dalam membentuk diskus intervertebralis. Meskipun mengalami regresi seluruhnya di regio korpus vertebrae, notokord menetap dan membesar di regio diskus internvertebralis. Di sini notokord ikut membentuk nukleus pulposus, yang kemudian dikelilingi oleh serat – serat sirkular anulus fibrosus. Kedua struktur ini berkombinasi membentuk diskusi intervertebralis (Sadler, 2009).

Resegmentasi sklerotom menjadi vertebra definitif menyebabkan miotom menjembatani diskus – diskus intervertebralis, dan perubahan ini memungkinkan miotom menggerakkan tulang belakang. Dengan alasan yang sama, arteri intersegmentalis yang mula – mula terletak antara sklerotom – sklerotom, kini berjalan di pertengahan di atas korpus vertebrae. Namun, saraf spinal menjadi terletak di dekat diskus intervertebralis dan meninggalkan kolumna vertebralis melalui foramen intervertebralis (Sadler, 2009).

2.3.4 Mekanisme Terjadinya Malformasi Struktur Anatomi Vertebra

Gen HOX merupakan kelompok gen evolusi yang menyandi faktor transkripsi yang mengatur awal proses perkembangan morfogenetik dan diekspresikan secara berlanjut hingga dewasa. Homeodomain merupakan DNA esensial yang mengikat domain yang terdapat di dalam semua gen HOX yang teridentifikasi hingga sekarang. Pada vertebrata, khususnya

manusia dan tikus, terdapat total 39 gen HOX yang disusun dalam empat kelompok yang berbeda (Quinonez *et al.*, 2013).

Pada empat kelompok yang terdapat di manusia terdapat empat kromosom yang berbeda dan berisi 9 sampai 10 gen. Empat kelompok tersebut ialah adalah *HOXA*, *HOXB*, *HOXC*, *HOXD*, terletak pada kromosom *7p14*, *17q21*, *12q13*, dan *2q31*. Karena duplikasi dan penyebaran gen HOX, vertebrata telah mendapat fungsional redundansi dalam bentuk 4 kelompok gen HOX. Setiap kelompok paralog, yang terdiri atas 2 sampai 4 gen, berbagi kemampuan untuk mempengaruhi perkembangan pada area ekspresi dalam embrio, fenomena ini disebut nonallelic non-komplementasi. Hal ini terbukti dalam sebuah penelitian yang melibatkan satu gen HOX yang hilang-fungsi mutasinya yang mana menunjukkan fenotip yang normal, tetapi memperlihatkan fenotip yang jauh lebih parah saat terjadi sistem gugur 2 atau 3 kali lipat gen yang diproduksi. Sebanyak 10 gen HOX diketahui dapat menyebabkan atau mempengaruhi kondisi manusia yaitu, *HOXA1*, *HOXA2*, *HOXA11*, *HOXA13*, *HOXB1*, *HOXB13*, *HOXC13*, *HOXD4*, *HOXD10*, dan *HOXD13* (Quinonez *et al.*, 2013).

Menggunakan genome-wide linkage dan candidate gene analysis, teridentifikasi missens mutasi (c.956T>A; M319K) heterozigot dalam *HOXD10* yang tersegregasi dengan penyakit. Residu yang diubah dalam metionin di homeodomain dari *HOXD10* dan dapat menyebabkan penyakit melalui hiploinsufisiensi dan peningkatan fungsi yang asing. Dari gen *HOXD10* terdapat perubahan penampakan kolom vertebral dan tulang *hindlimb* dengan disertai penurunan jumlah saraf yang menginvasi otot – otot

dari kaki. Secara spesifik menunjukkan transformasi homeotik tulang vertebra sakral ke arah paling anterior vertebra (Quinonez *et al.*, 2013).

2.3.5 Teratologi

Teratologi adalah kelahiran bayi yang abnormal akibat gangguan zat asing yang masuk ke dalam tubuh ibu (Tampubolon, 2000). Studi tentang asal mula embriologis dan kuasa berbagai cacat lahir (teratogen) disebut teratologi (Sadler, 2009). Teratologi merupakan bagian embriologi eksperimental yang berusaha menjelaskan hubungan sebab-akibat pada terjadinya berbagai malformasi. Salah satu aspeknya ialah penelitian semua obat baru terhadap khasiat teratogenik melalui percobaan pada hewan (Drews, 1996). Zat yang menyebabkan efek teratogenik disebut dengan teratogen. Teratogen adalah senyawa organik maupun anorganik yang merupakan salah satu zat yang bersifat toksis (zat yang dapat meruak siste biologis dari makhluk hidup) (Tampubolon, 2000). Senyawa kimia selain bersifat toksik juga dapat bersifat teratogenik. Pemberian bahan kimia selama periode organogenesis pada hewan betina yang sedang bunting dapat menyebabkan kelainan perkembangan atau bersifat teratogenik karena merupakan periode yang sensitif (Susantin *et al.*, 2006).

2.3.6 Prinsip Zat Teratogen

Menurut Sadler (2006), faktor – faktor yang mempengaruhi suatu zat untuk menimbulkan kecacatan saat lahir sudah didefinisikan dan diajukan sebagai prinsip teratologi. Prinsip tersebut meliputi:

1. Kerentanan terhadap teratogenesis yang bergantung pada genotipe konseptus dan cara bagaimana komposisi genetik ini berinteraksi dengan lingkungan.

2. Kerentanan terhadap teratogen bervariasi sesuai stadium perkembangan saat pajanan.
3. Manifestasi gangguan perkembangan bergantung pada dosis dan lama pajanan ke teratogen.
4. Teratogen bekerja melalui mekanisme spesifik pada sel dan jaringan yang sedang berkembang untuk memicu kelainan embriogenesis (patogenesis).
5. Manifestasi kelainan perkembangan adalah kematian, malformasi, retardasi pertumbuhan, dan gangguan fungsional.

Menurut data yang sudah tersedia mengenai kerja faktor teratogenik pada mamalia, beberapa prinsip dasar telah dikemukakan. Walaupun masih awal untuk menyusun ini sebagai hukum. Prinsip ini harus diingat dalam mempertimbangkan kemungkinan bahwa kelainan dipengaruhi oleh faktor teratogenik tertentu yaitu :

1. Tingkat perkembangan mudigah menentukan kepekaan terhadap faktor – faktor teratogenik.
2. Pengaruh faktor teratogenik tergantung pada genotip
3. Zat teratogenik bekerja dengan cara khusus pada segi tertentu metabolisme sel

Penggunaan obat pada saat perkembangan janin dapat mempengaruhi struktur janin pada saat terpapar. Mekanisme berbagai obat yang menghasilkan efek teratogenik disebabkan oleh beberapa faktor :

1. Obat dapat bekerja langsung pada ajingan ibu dan juga secara tidak langsung mempengaruhi jaringan janin.

2. Obat mengganggu aliran oksigen atau nutrisi lewat plasenta sehingga mempengaruhi janin.
3. obat juga dapat memberikan efek langsung pada proses diferensiasi pada jaringan janin yang sedang berkembang.

Diferensiasi zat esensial yang dibutuhkan janin juga berperan terjadinya abnormalitas (Zakiah dan Farn, 2011).

2.3.7 Klasifikasi *Food and Drugs Administration*

Untuk memberi tuntunan terapi, *Food and Drug Administration (FDA)* membuat suatu sistem untuk menentukan peringkat keamanan obat pada kehamilan. Sistem ini dirancang untuk membantu dalam menyederhanakan informasi manfaat-resiko dengan kategori – kategori yang dinyatakan dengan huruf – huruf seperti tercantum dalam klasifikasi. Banyak peringkat obat didasarkan pada data hewan, laporan kasus, dan data manusia yang terbatas atau tidak ada, dengan informasi yang jarang diperbarui (Cunningham *et al.*, 2014).

Tabel 2.1 Klasifikasi *Food and Drug Administration* (Cunningham *et al.*, 2014)

Kategori	Penjelasan
Kategori A	Studi – studi pada wanita hamil belum memperlihatkan adanya bahaya bagi peningkatan risiko kelainan janin jika diberikan selama trimester pertama (kedua, ketiga, atau semuanya)
Kategori B	Studi pada hewan memperlihatkan efek samping, tetapi studi-studi yang adekuat

	dan terkontrol baik pada wanita hamil gagal memperlihatkan risiko bagi janin selama trimester pertama kehamilan, dan belum ada bukti risiko pada trimester-trimester selanjutnya.
Kategori C	Studi-studi reproduksi hewan telah memperlihatkan bahwa obat ini bersifat teratogenik dan belum ada studi yang adekuat dan terkontrol baik pada wanita hamil.
Kategori D	Obat ini dapat membahayakan janin jika diberikan kepada wanita hamil. Jika obat ini digunakan selama kehamilan atau jika wanita hamil menggunakan obat ini maka perlu diberi tahu kemungkinan efek samping pada janinnya.
Kategori X	Obat ini dikontraindikasikan bagi wanita yang sedang atau akan hamil, karena dapat merugikan janin.

2.3.8 Mekanisme Genetik dan Fisiologi Teratogenitas

Teratogen cenderung bekerja dengan mengganggu proses – proses fisiologis, spesifik, yang menyebabkan kematian sel, perubahan pertumbuhan jaringan, atau kelainan diferensiasi sel. Karena kelainan proses fisiologis dapat terjadi i berbagai sel atau jaringan, maka pajanan teratogenik sering menimbulkan efek multipel. Pajanan dapat menyebabkan

berbagai kombinasi gangguan pertumbuhan, hambatan perkembangan, kelainan kraniofasial, hipoplasia falang distal, dan jarak puting payudara yang menjauh. Komposisi genetik pada janin dapat diketahui bahwa zat – zat antara oksidatif normalnya didetoksifikasi oleh epoksida hidrolase di sitoplasma, tetapi karena aktivitas epoksida hidrolase janin rendah maka terjadi penumpukan zat – zat antara oksidatif di jaringan janin. Radikal – radikal oksida bebas ini memiliki efek karsinogenik, mutagenik, dan toksik yang dependen dosis dan meningkat pada terapi dengan banyak jenis obat (Cunningham, *et al.*, 2014).

2.4 Tikus

Rattus norvegicus merupakan tikus yang pada awalnya asli dari Cina Utara. Namun, setelah melewati perjalanan spesies ini dapat mencapai tanh Eropa Timur pada awal abad ke 18. Saat ini *R. Norvegicus* dapat ditemukan di setiap benua kecuali Antartika. Di Asia, habitat tikus ini adalah di hutan tropis/ beriklim. Namun, diketahui tikus ini bisa hidup dan berkembang biak dimanapun selagi tempat tersebut terdapat makanan maupun tempat tinggal untuk mereka. Dan populasi tikus ini semakin meningkat pesat (Armitage, 2004).

Tikus putih atau rat (*Rattus sp.*) sering digunakan sebagai hewan percobaan atau hewan laboratorium karena telah diketahui sifat – sifatnya dan mudah dipelihara. Selain itu, penggunaan tikus sebagai hewan percobaan juga didasarkan atas pertimbangan ekonomis dan kemampuan hidup tikus hanya 2 – 3 tahun dengan lama produksi 1 tahun. Penggunaan tikus dalam penelitian reproduksi karena panjang waktu siklus birahi yang

pendek, yaitu 4 – 5 hari dan lama kehamilannya hanya selama 21 – 23 hari (Widodo, 2006).

2.4.1 Klasifikasi

Kingdom	: <i>Animalia</i>
Phylum	: <i>Chordata</i>
Subphylum	: <i>Vertebrata</i>
Kelas	: <i>Mamalia</i>
Ordo	: <i>Rodentia</i>
Famili	: <i>Muridae</i>
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>

(Armitage, 2004)

Tikus memiliki kemampuan reproduksi yang sangat tinggi. Baik pejantan maupun betina rata – rata matang secara seksual pada usia 2 – 3 bulan. Di alam, betina akan dikawini oleh pejantan (sering tidak hanya satu pejantan yang mengawini). Setelah kawin, ketertarikan betina mulai menurun dengan ditandai sikap yang agresif dan cenderung melarikan diri. Kehamilan berlangsung sekitar 20 – 21 hari dan selama beberapa hari sebelum melahirkan, betina akan membuat sarang untuk anaknya. Dan sikap agresi maternal akan berlangsung hingga minggu pertama kelahiran anaknya, setelah itu siklus reproduksinya akan berulang kembali (Koolhaas, 2010).

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina adalah mamalia yang tergolong ovulator spontan. Pada golongan ini ovulasi terjadi pada pertengahan siklus estrus yang dipengaruhi oleh adanya lonjakan LH

(*Luteinizing hormone*). Tikus termasuk hewan yang bersifat poliestrus, memiliki siklus reproduksi yang sangat pendek. Setiap siklus lamanya berkisar antara 4 -5 hari. Ovulasi sendiri berlangsung 8 – 11 jam sesudah dimulainya tahap estrus. Folikel yang sudah kehilangan telur akibat ovulasi akan berubah menjadi korpus luteum (KL), yang akan menghasilkan progesteron atas rangsangan LH. Progesteron bertanggung jawab dalam menyiapkan endometrium uterus agar reseptif terhadap implantasi embrio (Akbar, 2010).

2.4.2 Deskripsi Fisik

Rattus norvegicus merupakan anggota dengan ukuran cukup besar dalam keturunan keluarga tikus. Ukuran rata – rata tikus ini mencapai 400 mm (bila diukur dari hidung hingga ekor) dan berat mencapai 140 – 150 gram. Ukuran tikus jantan lebih besar dibanding betina. Dalam populasi alami, tubuh tikus ini ditutupi oleh bulu kecoklatan kasar di permukaan dorsal. Berbagai strain tikus yang dibesarkan di penangkaran berwarna putih, coklat, maupun hitam. Telinga dan ekor botak. Panjang ekor tikus ini lebih pendek dibanding panjang tubuhnya. Telinga *R.norvegicus* biasanya lebih pendek daripada spesies lainnya dan tidak menutupi mata ketika ditarik ke bawah (Armitage, 2004).

2.4.3 Reproduksi Tikus Betina

Tikus dan mencit memiliki banyak kemiripan dalam sistem maupun siklus reproduksi. Secara umum sistem reproduksi betina terdiri atas ovarium dan sistem duktus. Sistem tersebut tidak hanya menerima telur yang diovasikan dan membawa ke tempat implantasi di uterus, tetapi juga menerima sperma dan membawanya ke tempat implantasi di uterus,

tetapi juga menerima sperma dan membawanya ke tempat fertilisasi yaitu oviduk. Pertumbuhan, fungsi otot dan epitel saluran betina ada di bawah pengaruh hormon dan ditentukan oleh pergeseran progresif dalam sekresi estrogen dan progesteron oleh ovarium selama siklus ovarium (Akbar, 2010).

2.4.4 Siklus Reproduksi

Pada beberapa mamalia siklus reproduksi disebut juga sebagai siklus estrus. estrus atau birahi adalah suatu periode secara psikologis maupun fisiologis yang bersedia menerima pejantan untuk berkopulasi. Periode atau masa dari permulaan periode birahi ke periode birahi berikutnya disebut dengan siklus estrus (Akbar, 2010).

a. Fase Proestrus

Proestrus adalah fase sebelum estrus yaitu periode dimana folikel ovarium tumbuh menjadi folikel de graaf dibawah pengaruh FSH. Fase ini berlangsung 1 jam. Setiap folikel mengalami pertumbuhan yang cepat selama 2-3 hari sebelum estrus sistem reproduksi memulai persiapan untuk pelepasan ovum dari ovarium. Preparat apus vagina pada fase proestrus ditandai akan tampak jumlah sel epitel berinti dan sel darah putih berkurang, digantikan dengan sel epitel bertanduk, dan terdapat lendir yang banyak (Akbar, 2010).

b. Fase Estrus

Estrus adalah fase yang ditandai oleh penerimaan pejantan oleh hewan betina untuk berkopulasi, fase ini berlangsung selama 12 jam. Folikel de graaf membesar dan menjadi matang serta ovum mengalami perubahan kearah pematangan. Pada fase ini pengaruh kadar estrogen

meningkat sehingga aktivitas hewan menjadi tinggi, telinganya selalu bergerak-gerak dan punggung lordosis. Ovulasi hanya terjadi pada fase ini dan terjadi menjelang akhir siklus estrus. pada preparat apusan vagina ditandai dengan menghilangnya leukosit dan epitel berinti, yang ada hanya epitel bertanduk dengan bentuk tidak beraturan dan berukuran besar (Akbar, 2010).

c. Fase Metestrus

Metestrus adalah periode segera sesudah estrus dimana korpus luteum bertumbuh cepat dari sel granulosa folikel yang telah pecah di bawah pengaruh LH dan *adenohypophysis*. Metestrus sebagian besar berada di bawah pengaruh progesteron. Menjelang pertengahan sampai akhir metestrus, uterus menjadi agak lunak karena pengendoran otot uterus. Fase ini berlangsung selama 21 jam. Pada preparat apus vagina ciri yang tampak yaitu epitel berinti dan leukosit terlihat lagi dan jumlah epitel menanduk makin lama makin sedikit (Akbar, 2010).

d. Fase Diestrus

Diestrus adalah periode akhir dan terlama siklus birahi pada ternak dan mamalia. Fase ini berlangsung selama 48 jam. Korpus luteum menjadi matang dan pengaruh progesteron terhadap saluran reproduksi menjadi nyata. Mulai terjadi perkembangan folikel-folikel primer dan sekunder dan akhirnya kembali ke proestrus. Pada preparat apus vagina dijumpai banyak sel darah putih dan epitel berinti yang letaknya tersebar dan homogen (Akbar, 2010).

2.4.5 Periode Embrionik Tikus

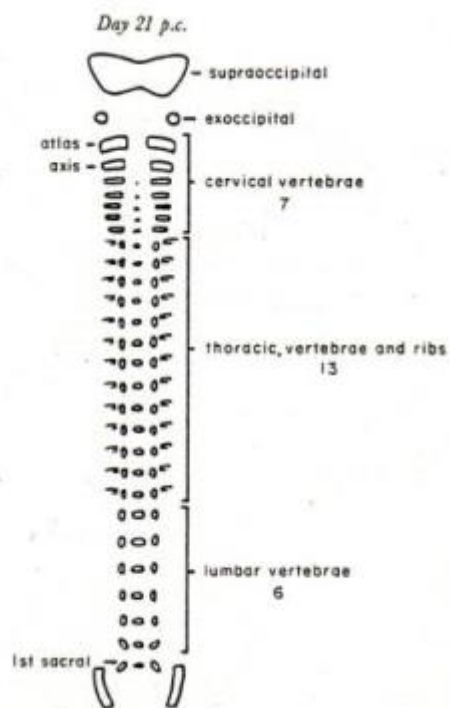
Pembelahan sel yang pertama pada tikus maupun mencit terjadi 24 jam (1 hari) setelah pembuahan. Pembelahan terjadi secara cepat di dalam oviduk dan berulang – ulang. Menjelang hari kedua setelah pembuahan embrio sudah terbentuk morula 16 sel. Bersamaan dengan pembelahan, embrio bergulir menuju uterus menjelang hari ketiga kehamilan embrio telah masuk ke dalam uterus, tetapi masih berkelompok – kelompok. Pada akhirnya embrio akan menyebar disepanjang uterus dengan jarak yang memadai untuk implantasi dengan ruang yang cukup selama pertumbuhan. Pada akhir tahap pembelahan akan terbentuk blastula. Blastula akan membentuk massa sel dalam dan *trophoblast* yang akan berkembang menjadi plasenta (Widodo, 2006).

Massa sel dalam akan berkembang menjadi plasenta. Massa sel dalam akan berkembang menjadi hipoblas dan epiblas, dimana epiblas akan berkembang menjadi embrio sedangkan hipoblas akan berkembang menjadi selaput ekstra embrio. Selanjutnya blastomer akan terimplantasi pada hari keempat kehamilan dan berakhir pada hari keenam kehamilan. Kemudian diikuti proses gastrulasi, yakni adanya perpindahan sel dan diferensiasi untuk membentuk lapisan ectoderm, mesoderm, dan endoderm. Akhir tahap perkembangan adalah proses pembentukan organ dari lapisan ectoderm, mesoderm, endoderm, dan derivat – derivatnya (Widodo, 2006).

Proses pembentukan tulang disebut dengan osifikasi atau osteogenesis yang dilakukan oleh sel osteoblas. Osteoblast dan matriks tulang adalah dua hal penting. Terdapat dua proses osifikasi, yaitu osifikasi intramembran dan osifikasi endokondral. Osifikasi intramembran

merupakan salah satu dari dua proses penting selama perkembangan janin dari sistem kerangka mamalia yang bertanggung jawab pada pembentukan jaringan tulang. Osifikasi intramembran terjadi selama pembentukan tulang tengkorak, mandibula, dan klavikula. Tulang terbentuk dari jaringan ikat seperti mesenkim. Osifikasi endokondral terjadi pada tulang panjang dan sebagian besar tulang dalam tubuh melibatkan tulang rawan hialin yang terus tumbuh. Hal ini juga merupakan proses penting selama pertumbuhan panjang tulang dan terlibat dalam proses alami dalam penyembuhan patah tulang (Nandeesh dan Usha, 2012).

Tulang terdiri dari sel – sel pendukung, yaitu osteoblast dan osteosit, renovasi sel, yaitu osteoklas dan matriks non mineral kolagen serta protein yang disebut noncollagenous osteoid dengan garam mineral anorganik disimpan dalam matriks (Nandeesh dan Usha, 2012).



Gambar 2.3 Susunan Tulang Belakang Tikus Normal (Darmanto, 2005)

Dapat dilihat pada gambar 2.3 yang menunjukkan keadaan normal susunan tulang belakang pada tikus. Jumlah ruas – ruas pada *cervical vertebrae* terdapat 7 pasang ruas. Pada *thoracic, vertebrae*, dan tulang rusuk terdapat 13 pasang ruas dan *lumbar vertebrae* ada 6 pasang ruas dan satu pasang ruas *sacral* pada bagian paling kaudal (Darmanto, 2005).

2.4.6 Mekanisme Malformasi Struktur Anatomi Vertebra Tikus

Ekor bengkok terjadi karena kelainan struktur anatomis vertebra ekor: vertebra lebih kecil dan jarak antar vertebra berhimpitan. Diduga kelainan ini dimulai sejak awal pembentukan blastema vertebra. Pembentukan vertebra dimulai sejak kebuntingan 10 hari. Pada saat ini sel – sel mesenkim dari skerotom bermigrasi ke arah medial mengelilingi korda dorsalis dan berkembang menjadi blastema sentrum dari satu vertebra. Tiap sentrum dibangun oleh sel – sel yang berasal dari somit berurutan. Hambatan pada migrasi mesenkim dari salah satu arah menyebabkan struktur anatomi sentrum yang terbentuk mengalami kelainan berupa ukuran yang lebih kecil dan jarak yang berhimpitan. Kelainan tersebut menyebabkan terhambatnya pertumbuhan *arcus* dan *processus* yang merupakan tonjolan sentrum. Terhambatnya pertumbuhan sentrum, *arcus* dan *processus* menyebabkan vertebra ekor kecil dan kurang tegar, sehingga bisa terjadi pembengkokan berlebihan jika selama perkembangannya terdapat gangguan fisik atau mekanik (Santoso, 2004).

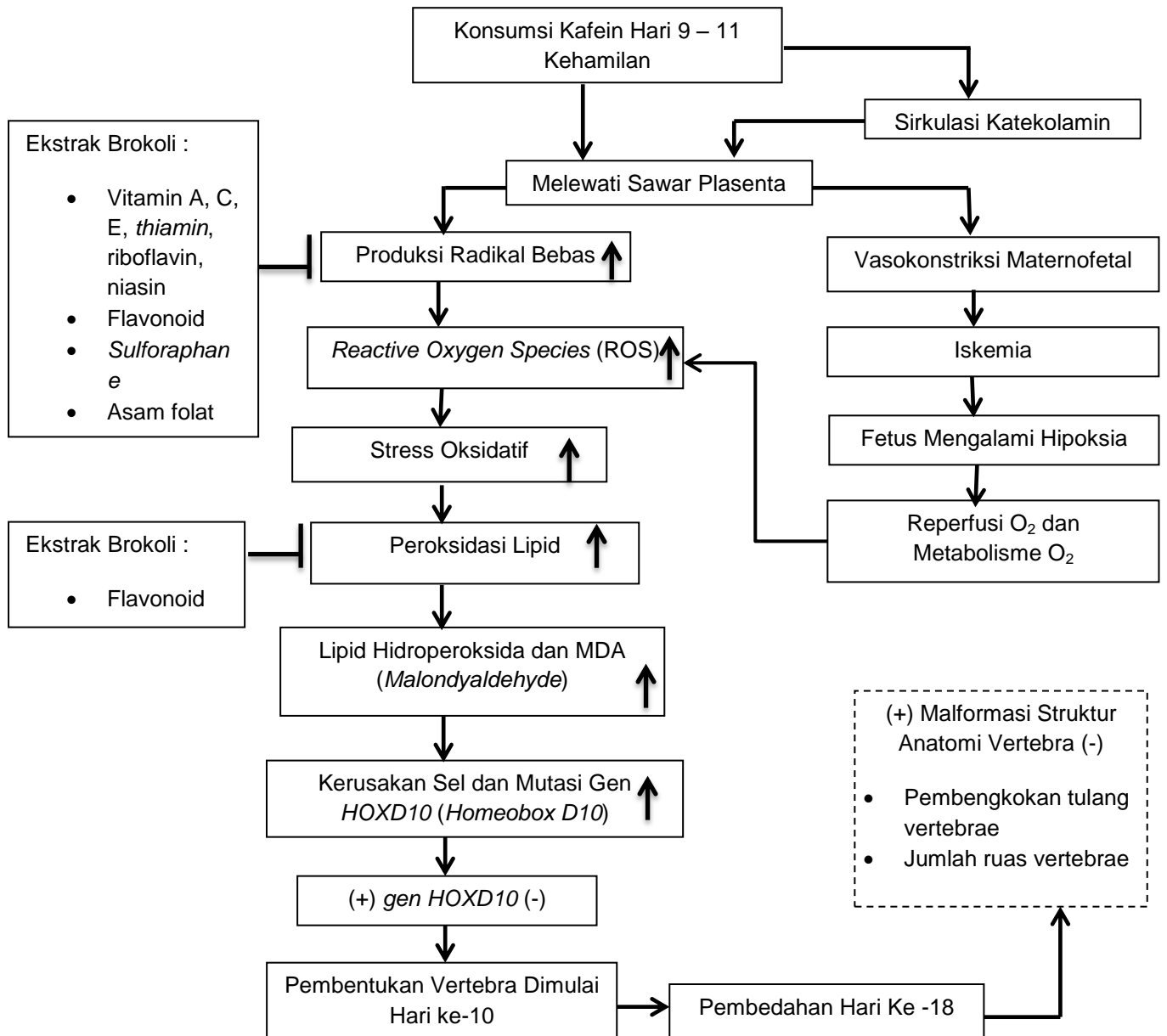
“Jembatan *costae*” diduga disebabkan gangguan mitosis. Kafein menurunkan aktivitas polimerase DNA dan menginduksi mitosis sebelum

replikasi DNA berakhir pada fase sintesis. Polimerase DNA berfungsi mempolimerisasi nukleotida. Jika aktivitas enzim ini menurun, biosintesis/replikasi DNA terhambat atau tidak sempurna, sehingga penggandaan kromosom dan sintesis RNA terganggu, dan akhirnya dapat berbentuk jenis protein baru atau asing. Protein baru dapat membuat protein asal bertambah atau hilang sehingga mengacaukan organogenesis. Jadi, kelainan berupa “jembatan *costae*” diduga karena adanya gangguan ekspresi gen, sehingga terbentuk protein baru untuk pembentukan “jembatan *costae*” (Santoso, 2004).

BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep



Variabel yang tidak diteliti



Variabel yang diteliti



Meningkat



Menghambat

3.2 Penjelasan Kerangka Konsep

Kafein yang dikonsumsi dengan dosis tinggi selama masa kehamilan dapat berdampak pada janin yang dikandung karena kafein dapat melewati sawar plasenta dan mencapai janin. *Paraxenthine* merupakan kandungan di dalam kafein yang dapat dengan mudah melewati sawar plasenta. *Paraxenthine* merupakan derivat *xanthine* yang menjadi penyebab terjadinya OFR (*Oxygene Free Radical*). Kafein memiliki peran dalam meningkatkan jumlah produksi radikal bebas di dalam tubuh.

Di dalam tubuh manusia, senyawa penangkal radikal bebas, yaitu antioksidan, dapat dibentuk secara alami. Namun, apabila produksi radikal bebas melonjak pesat dan tubuh tidak dapat mengkompensasi karena tidak dapat memproduksi antioksidan alami dalam jumlah yang pesat pula untuk mengimbangi perlonjakan radikal bebas, maka akan terjadi ketidakseimbangan antara antioksidan dan radikal bebas. Kejadian ini akan menyebabkan peningkatan ROS (*Reactive Oxygene Species*) serta memicu peningkatan stress oksidatif.

Peningkatan ROS dapat pula dipicu oleh metabolisme oksigen dan reperfusi oksigen pada saat keadaan hipoksia. ROS dapat memicu terjadinya peroksidasi lipid yang akan menghasilkan MDA (*Malondyaldehyde*) dan lipid hidroperoksida. MDA dapat berdampak buruk pada mamalia karena sifatnya yang mutagenik pada sel mamalia. MDA juga dapat bereaksi terhadap basa DNA yang menghasilkan kerusakan pada basa atau rantai DNA.

Radikal bebas dapat memicu terjadinya perubahan genetik, seperti mutasi dan penyusunan ulang pada kromosom. Pada periode embrionik,

vertebra terbentuk dari bagian sklerotom somit yang berasal dari mesoderm paraksial. Bagian sklerotom dari masing – masing somit juga akan mengalami resegmentasi. Setiap vertebrae akan dibentuk oleh kombinasi separuh kaudal satu somit dan separuh kranial somit di dekatnya. Pembentukan pola vertebrae ini diatur oleh gen – gen HOX. Gen HOX merupakan gen yang menyandi faktor transkripsi dan mengatur awal proses perkembangan morfogenik dan mengekspresikan gen sampai dewasa. Gen HOX terdiri atas berbagai macam dan telah dipetakan dalam beberapa kelompok.

Telah diketahui bahwa gen HOXD10 yang mengalami missens mutasi dapat memberikan dampak pada perubahan ruang/celah pada vertebral dan juga berpengaruh pada tulang hindlimb dengan disertai penurunan jumlah saraf yang menginvasi otot – otot dari kaki. Pada proses pembentukan vertebra juga diketahui bahwa cukup sering terjadi penyatuan yang asimetris antara dua vertebra yang berdekatan atau hilangnya separuh dari satu vertebra yang menjadi salah satu penyebab pembengkokan tulang belakang ke arah lateral. Jumlah vertebra juga tidak sesuai dengan normalnya. Selain dapat membahayakan janin karena dapat melewati sawar plasenta, kafein juga dapat meningkatkan produksi katekolamin dalam tubuh.

Katekolamin ini juga dapat melintasi sawar plasenta dan berdampak pada vasokonstriksi uteroplasental. Vasokonstriksi ini dapat menyebabkan terjadi iskemia dan memicu terjadi hipoksia pada janin. Hipoksia adalah keadaan dimana rendahnya oksigen pada tubuh/jaringan, oksigen sendiri berfungsi dalam proses metabolisme sel. Pada akhirnya keadaan hipoksia

ini akan memicu terjadinya stress oksidatif karena telah menyebabkan reperfusi oksigen dan metabolisme oksigen dalam tubuh. Terjadinya peroksidasi lipid juga dapat menyebabkan kerusakan pada fluiditas dan elastisitas membran sel, sehingga merusak fungsi membran sel sebagai pelindung sel, yang mana akan berdampak pada kerusakan sel.

Ekstrak brokoli memiliki berbagai macam kandungan yang baik untuk tubuh, diantaranya adalah vitamin A, C, E, *thiamin*, riboflavin, niasin, asam folat, beta karoten, *sulforaphane*, dan flavonoid. Saat terjadi perlonjakan radikal bebas akibat mengonsumsi kafein, maka ekstrak brokoli dapat membantu antioksidan alami dalam tubuh untuk mengimbangi radikal bebas tersebut. Dan senyawa flavonoid yang ada dalam ekstrak brokoli juga sebagai inhibitor kuat peroksidasi lipid. Sehingga dapat mencegah terjadi peroksidasi lipid, MDA pun tidak akan dihasilkan dan kerusakan genetik tidak akan terjadi, sehingga malformasi struktur anatomi vertebra tidak terjadi.

3.3 Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian ini adalah ekstrak brokoli (*Brassica oleracea L.*) dapat berpengaruh terhadap terjadinya malformasi struktur anatomi vertebra pada janin tikus putih strain wistar (*Rattus norvegicus*) yang disebabkan oleh kafein.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rencana Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen mumi (*true experimental design*) di laboratorium secara in vivo menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design* yaitu rancangan yang digunakan untuk mengukur pengaruh perlakuan pada kelompok eksperimen dengan cara membandingkan perlakuan dengan kelompok kontrol.

4.2 Populasi dan Sampel

Sampel penelitian adalah tikus putih strain wistar (*Rattus norvegicus*). Jenis kelamin tikus yang digunakan untuk percobaan adalah tikus betina yang sehat dan sebelum diberi perlakuan akan dikawinkan terlebih dahulu dengan tikus jantan agar terjadi kehamilan. Penelitian ini membagi sampel dalam lima kelompok perlakuan, yaitu :

1. Kelompok kontrol negatif (n=5) : sampel tanpa diberikan kafein dan ekstrak brokoli.
2. Kelompok kontrol positif (n=5) : sampel diberikan kafein dosis 80 mg/kgBB intraperitoneal tanpa diberikan ekstrak brokoli pada hari ke 9 – 11 kehamilan.
3. Kelompok I (n=5) : sampel diberikan kafein dosis 80 mg/kgBB secara intraperitoneal dan ekstrak brokoli dosis 1 (200 mg/kgBB) dengan cara peroral pada hari ke 9 – 11 kehamilan.

4. Kelompok II (n=5) : sampel diberikan kafein dosis 80 mg/kgBB secara intraperitoneal dan ekstrak brokoli dosis 2 (400 mg/kgBB) dengan cara peroral pada hari ke 9 – 11 kehamilan.
5. Kelompok III (n=5) : sampel diberikan kafein dosis 80 mg/kgBB secara intraperitoneal dan ekstrak brokoli dosis 3 (800 mg/kgBB) dengan cara peroral pada hari ke 9 – 11 kehamilan.
6. Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\{(np - 1) - (p - 1)\} \geq 16 \text{ (Sastroasmoro, 1995)}$$

Keterangan :

n = jumlah sampel tiap perlakuan

p = jumlah perlakuan

Jumlah sampel tiap perlakuan yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

$$\{(np - 1) - (p - 1)\} \geq 16$$

$$\{(5n - 1) - (5 - 1)\} \geq 16$$

$$5n - 5 \geq 16$$

$$5n \geq 21$$

$$n \geq 4,2$$

Dengan demikian dapat diambil sampel ≥ 4 untuk tiap perlakuan. Agar diperoleh data yang lebih teliti, masing – masing perlakuan digunakan sampel sebanyak 5 ekor tikus, sehingga total keseluruhan sebesar 25 ekor tikus.

4.2.1 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

- a. Kriteria inklusi

Tikus *Rattus norvegicus strain wistar* betina yang sehat, berbulu putih dan tampak aktif, berusia 3 – 4 bulan dengan berat badan 200 -250 grams, warna bulu putih.

b. Kriteria eksklusi

Tikus yang tampak lemas atau mati dan tikus yang selama penelitian tidak mau makan.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pengaruh ekstrak brokoli (*Brassica olerace L.*) dengan dosis yang berbeda , yaitu dosis 1 (200 mg/kgBB), dosis 2 (400 mg/kgBB), dan dosis 3 (800 mg/kgBB) terhadap kejadian malformasi struktur anatomi vertebra.

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kejadian malformasi struktur anatomi vertebra pada janin tikus putih strain wistar (*Rattus norvegicus*) yang disebabkan oleh kafein.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Pemeliharaan hewan coba selama penelitian serta lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Penelitian dilaksanakan pada bulan Desember - Februari 2016.

4.5 Alat dan Bahan

a. Perawatan Tikus

Alat : bak plastik berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm untuk kandang tikus, tutup kandang tius dari kawat dengan ukuran 36,5 cm x 28 cm x 15,5 cm, botol air, sekam, timbangan berat badan.

b. Pembuatan Ransum Makanan Tikus

Alat : timbangan, neraca analitik, baskom, pengaduk, gelas ukur, penggilingan pakan, nampan.

c. Ekstraksi Brokoli (*Brassica oleracea L.*)

Alat : pipet, pisau, batang pengaduk, gelas ukur, tabung reaksi, neraca analitik, blender, *mesh* untuk maserasi brokoli, *overhead stirrer* untuk mengaduk simplisia dengan etanol, batang pengaduk, *rotary evaporator* dan *vacum drying* untuk menghilangkan pelarut pada maserasi, filter berukuran 0,2 – 0,4 μ untuk filtrasi sediaan ekstrak.

Bahan : simplisia brokoli, etanol 70%, aquades, dan botol hasil ekstrak

d. Pelarutan Kafein Murni

Alat dan bahan : wadah, pengaduk, dan air

e. Pemberian Ekstrak Brokoli dan Kafein

Alat dan bahan : spuit, larutan kafein murni, dan ekstrak brokoli

f. Pewarnaan Jann Tikus

Bahan : *Alizarin Red-Alician Blue*

g. Pengamatan Malformasi Struktur Anatomi Vertebra

Alat : strereomikroskop

4.6 Definisi Operasional

1. Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus jenis *Rattus norvegicus* betina usia 3 – 4 bulan, dengan berat badan 200

– 250 gram yang akan dikawinkan dengan tikus jantan agar terjadi kehamilan, kemudian diberi perlakuan pada hari ke 9 – 11 kehamilan.

2. Kafein

Kafein yang digunakan dalam penelitian ini adalah kafein murni dalam bentuk bubuk yang didapat dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. Dosis kafein yang diberikan pada setiap tikus adalah 80 mg/kgBB, sehingga jumlah kafein yang diperlukan dalam penelitian sebanyak 1,2 gram. Dengan menyesuaikan kapasitas maksimal lambung tikus (5 ml), maka dosis kafein 80 mg/kgBB dilarutkan dalam air steril (*aquades*) hingga volumenya tidak melebihi kapasitas lambung. Diberikan secara intraperitoneal menggunakan spuit.

3. Ekstrak Brokoli (*Brassica oleracea L.*)

Untuk memperoleh simplisia brokoli dan proses ekstraksi dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. Proses ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% kemudian ekstrak yang diperoleh kemudian diuapkan dan dipekatkan, hingga didapat ekstrak kental. Jumlah simplisia kering brokoli yang akan diekstrak yaitu sebanyak 100 gram, sehingga menghasilkan jumlah ekstrak kental 7 gram. Besar dosis untuk perlakuan didasari oleh penelitian Black, *et al*/ yang melaporkan bahwa suplementasi brokoli sebanyak 200 mg/kgBB dapat mencegah terjadinya serebral palsy yang disebabkan oleh insufisiensi plasenta. Maka dari itu, pada penelitian ini diterapkan pemberian ekstrak brokoli dengan tiga dosis berbeda yaitu

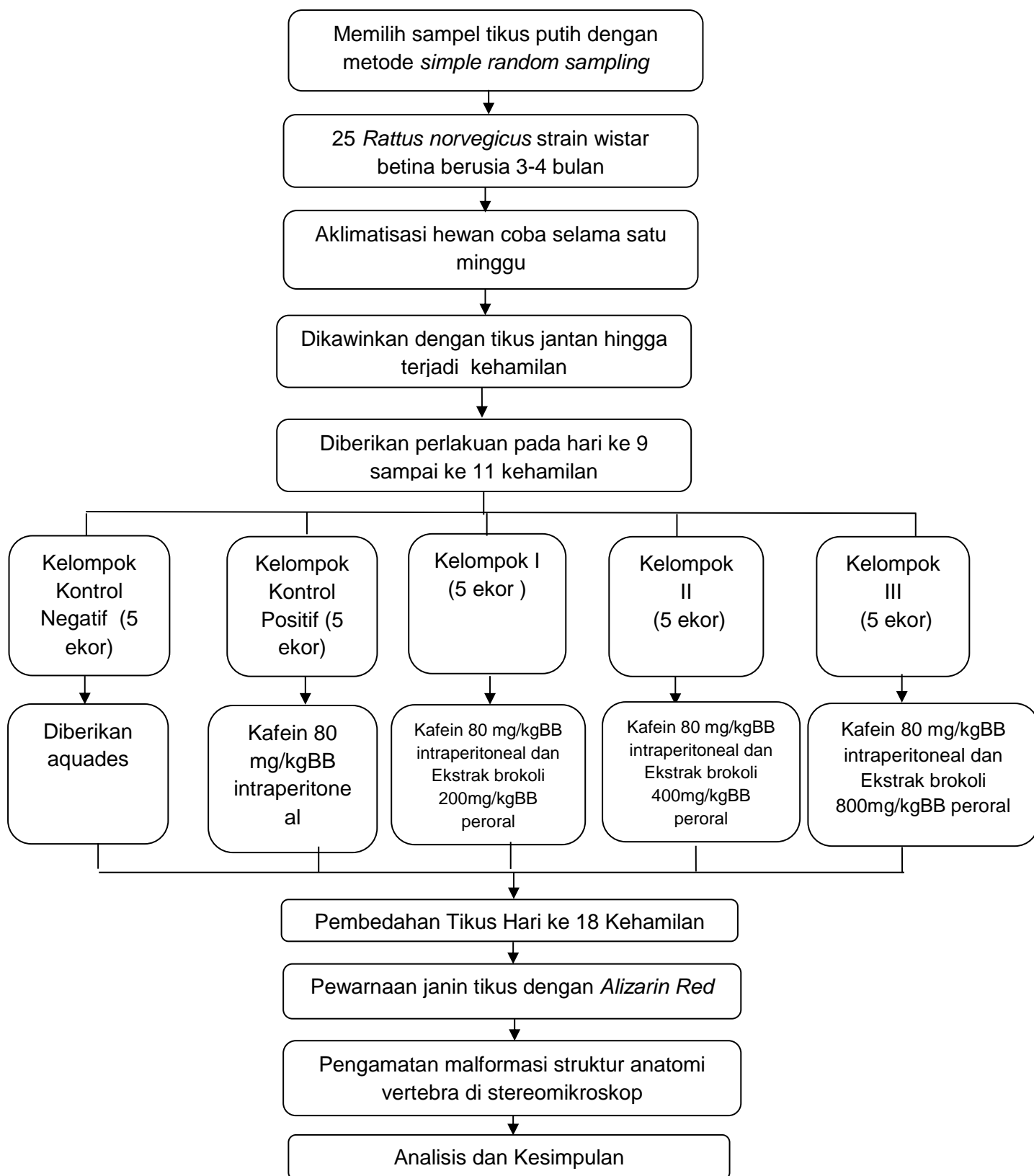
200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB, dan 800 mg/kgBB. Diberikan dengan cara peroral menggunakan spuit yang telah diganti jarumnya untuk peroral.

4. Malformasi

Kejadian malformasi struktur anatomi vertebra, berupa pembengkokan tulang karena terhambatnya pembentukan *arcus* dan *processus* serta berkurang atau tidaknya ruas vertebra, dapat diamati pada hari ke 18 kehamilan yang akan dilakukan pembedahan pada tikus. Setiap janin tikus yang lahir akan diberikan pewarnaan pada tulangnya lalu diamati dan dibandingkan sudut kelengkungan tulang belakang antar kelompok, apakah terjadi malformasi pada struktur anatomi vertebra atau tidak.

4.7 Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk memperoleh pengetahuan mengenai pengaruh ekstrak brokoli terhadap malformasi pada struktur anatomi vertebra pada janin tikus (*Rattus norvegicus*) yang disebabkan oleh kafein. Alur penelitian dapat dijelaskan melalui bagan berikut :



Gambar 4.1 Prosedur Penelitian

4.7.1 Aklimatisasi

Selama proses aklimatisasi, semua tikus diberi pakan standar (normal). Masing – masing tikus mendapat 30 gram dan diberikan secara *ad libitum* selama 7 hari (1 minggu).

4.7.2 Perawatan Tikus

Tikus ditimbang dan dilakukan aklimatisasi selama satu minggu di dalam kandang berukuran 45 cm x 35,5 cm x 14,5 cm yang telah diberi sekam, tiap kandang berisi 5 ekor tikus. Tikus diberi air minum dan diet normal 1 kali sehari. Sekam pada kandang tikus diganti setiap harinya.

4.7.3 Pengawinan Hewan Percobaan

Pengawinan hewan dilakukan pada masa estrus dengan memasukan 1 ekor jantan ke kandang yang berisi 3 ekor betina pada sore hari. Keesokan paginya dilakukan pengamatan di daerah vagina, jika ditemukan sumbat vagina (vaginal plug, maka tikus dinyatakan kawin, bila sumbat vagina tidak ditemukan dilanjutkan dengan cara membuat apusan vagina).

Cara membuat apusan vagina yaitu mengusapkan cotton bud di bagian vagina tikus betina, kemudian ditoreskan pada kaca objek dan diberikan cairan *NaCl* fisiologi. Lihat pada mikroskop dengan pembesaran 40x. Tikus dinyatakan kawin apabila ditemukan sperma dalam apusan vaginanya. Tikus yang terbukti kawin dinyatakan sebagai hari ke 0 dari kehamilan.

4.7.4 Ekstraksi

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cairan penyari. Cairan pelarut dalam pembuatan ekstrak adalah pelarut yang optimal untuk senyawa kandungan yang berkhasiat atau yang aktif, dengan demikian senyawa tersebut dapat terpisahkan dari bahan, serta ekstrak hanya mengandung sebagian besar senyawa kandungan yang diinginkan. Dalam hal ekstrak total, maka pelarut dipilih yang melarutkan hampir semua metabolit sekunder yang terkandung. Faktor utama untuk pertimbangan pemilihan cairan penyaring terdiri dari berbagai aspek yaitu selektivitas, kemudahan bekerja dan proses dengan cairan tersebut, ekonomis, ramah lingkungan dan keamanan (Depkes RI, 2000).

4.7.5 Maserasi

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan yang kontinu (Depkes RI, 2000). Dalam penelitian ini, ekstrak brokoli diperoleh dari metode maserasi dengan pelarut etanol 70% dan hasilnya berupa ekstrak kental. Ekstrak kental kemudian dapat langsung diberikan secara intraperitoneal kepada tikus.

4.8 Langkah Penelitian

1. Langkah I

Brokoli ditimbang sebanyak 2,4 kg kemudian dilakukan pengeringan dan penyerbukan. Setelah itu baru dilakukan

pengekstrakan dengan maserasi berulang menggunakan etanol 70%. Ekstrak yang diperoleh kemudian diuapkan dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* tekanan rendah bersuhu 65°C, hingga didapat ekstrak kental. Penelitian menggunakan sampe sebanyak 25 ekor tikus putih strain wistar dibagi menjadi 5 kelompok (berdasarkan rumus Federer) diadaptasikan selama satu minggu di laboratorium dan diberi pakan standar. Kafein yang digunakan adalah kafein murni berupa bubuk, kemudian dilarutkan dengan air untuk diberikan secara intraperitoneal kepada tikus.

2. Langkah II

Dilakukan pemeriksaan tikus jantan dan betina yang sehat, berat badan antara 200 – 250 gram dan berusia 3 – 4 bulan. Kemudian tikus diberikan pakan pellet di laboratorium seperti biasa. Dengan suhu ruangan yang cocok 23 - 25°C dan keramaian lingkungan sekitar 45 – 55%. Tikus betina dikawinkan dengan tikus jantan hingga hamil yang ditandai dengan adanya vaginal plug dan disebut dengan hari pertama kehamilan.

3. Langkah III

Tikus yang sudah hamil (N=25), dibagi dalam 5 kelompok, dan diberikan perlakuan sebagai berikut :

- a. Kelompok kontrol negatif : diberikan aqua tanpa kafein dan ekstrak brokoli
- b. Kelompok kontrol positif : diberikan kafein dengan dosis 80 mg/kgBB
- c. Kelompok I : diberikan kafein 80 mg/kgBB intraperitoneal dan ekstrak brokoli dosis 1 (200 mg.kgBB) dengan cara peroral

- d. Kelompok II : diberikan kafein 80 mg/kgBB intraperitoneal dan ekstrak brokoli dosis 2 (400 mg.kgBB) dengan cara peroral
- e. Kelompok III : diberikan kafein 80 mg/kgBB intraperitoneal dan ekstrak brokoli dosis 3 (800 mg.kgBB) dengan cara peroral

Perlakuan diatas, dimulai pada hari ke 9 sampai 11 kehamilan. Kemudian akan dilakukan pembedahan pada hari ke 18 kehamilan, dan akan diamati kejadian malformasi pada struktur anatomi vertebra dengan menggunakan pewarnaan alizarin red dan dibandingkan antar kelompok.

4. Langkah IV

Setelah hari ke 18 kehamilan, maka akan dilakukan pembedahan pada tikus dimana dalam pelaksanaannya ini perlu persiapan agar pekerjaannya lebih lancar dan perlakuan yang dilakukan tidak mempengaruhi hasil penelitian. Adapun tahap – tahap prosedur pembedahan tikus, antara lain :

- a. Tikus dimatikan dengan cara *cervical dislocation* (dislokasi leher).
- b. Posisikan tikus pada papan bedah menggunakan *pins*.
- c. Bedah pada bagian uterus menggunakan gunting bengkok.
- d. Ambil janin tikus dan tempatkan pada wadah yang aman.

Adapun langkah – langkah perispaan pewarnaan pada janin tikus :

- a. Mempersiapkan larutan KOH (4%, 2%, dan 1%).
- b. Larutan pewarna alizarin red disiapkan dan dibuat stok (cadangan).
- c. Pewarna alizarin red bubuk dilarutkan dalam 50% larutan asetat hingga jenuh kemudian diambil se.banyak 5 mL dan ditambahkan larutan gliserin PA sebanyak 10 mL.

- d. Alkohol hidrt 1% ditambahkan sebanyak 60 mL kemudian diaduk hingga merata dan stok sudah siap.
- e. Larutan pewarna dibuat dengan menambahkan 1 mL larutan alizarin red yang sudah dibuat ke dalam 100 mL larutan KOH 2% pada temperatur ruang.
- f. Larutan penjernih dibuat dengan cara sebagai berikut :

Tabel 4.1 Larutan Penjernih (Riswiyanto, 2005)

Larutan penjernih A	Gliserin (20 bagian), KOH 4% (3 bagian) dan Akuades (77 bagian)
Larutan penjernih B	Gliserin (50 bagian), KOH 4% (3 bagian) dan Akuades (47 bagian)
Larutan penjernih C	Gliserin (75 bagian) dan Akuades (25 bagian)

Adapun metode pewarnaan pada janin tikus yaitu :

- a. Dilakukan pembedahan tikus pada hari ke 18 kehamilan, kemudian janin diambil dan diletakkan di gelas arloji.
- b. Bersihkan janin tersebut dari membran ekstra embrional dan bulu – bulu atau kotoran agar tidak mengganggu saat proses klasifikasi,
- c. Janin dimasukkan ke dalam botol bening yang berisi alkohol 90% selama 12 jam. Larutan alkohol ini bersifat fiksatif.
- d. Larutan alkohol 96% dibuang dan diganti dengan larutan KOH 1% selama \pm 3 jam pada botol yang sama.

- e. Larutan KOH 1% dibuang dan diganti akuades larutan alizarin red pada botol yang sama selama 3 jam.
- f. Larutan diganti dengan larutan KOH 2% selama 30 menit.
- g. Larutan diganti dengan larutan penjernih A selama 1 jam dan dilanjutkan penggantian dengan larutan penjernih B dan penjerni C masing – masing selama 1 jam.
- h. pengamatan (Riswiyanto, 2005).

Larutan – larutan yang digunakan dalam percobaan ini mempunyai fungsi masing – masing. Larutan alkohol berfungsi sebagai fiksatif. Larutan KOH berfungsi agar otot menjadi transparan dan skeletonnya terlihat jelas. Larutan pewarna alizarin red berfungsi agar skeleton berwarna merah sehingga dapat terlihat jelas. Larutan penjernih A, B, dan C berfungsi untuk mengurangi kelebihan pewarnaan yang masuk ke dalam jaringan otot sehingga otot menjadi tampak jernih transparan. Sedangkan, larutan gliserin berfungsi sebagai larutan media penyimpanan (Fatur Rahman, 2014).

5. Langkah V

Setelah janin dimasukan ke dalam laruat gliserin dilanjutkan dengan pengamatan struktur anatomi vertebra janin untuk melihat kecacatan yang terjadi. Janin diposisikan secara menyamping sehingga dapat dilihat dengan jelas gambaran tulang vertebra janin untuk pengukuran sudut. Pengamatan perubahan struktur anatomi vertebra janin dilakukan dengan membandingkan antara kelompok kontrol negatif dan kelompok kontrol positif serta kelompok perlakuan lainnya yang mencakup adanya pembengkokan tulang belakang karena

terhambatnya pertumbuhan *arcus* dan *processus* dengan menggunakan mikroskop stereo. Janin diletakan pada wadah kaca yang datar dan diamati di bawah mikroskop stereo dengan perbesaran 20 kali. Mikroskop tersebut disambungkan ke laptop atau komputer dengan *software OPTILAB*. Foto janin akan diambil dari sisi punggung janin dan sisi samping (kanan dan kiri) janin). Selanjutnya hasil foto janin dicetak dan mulai diukur untuk sudut kebengkokan tulang belakangnya dengan cara :

- a. Ambil titik tengah dari jumlah total ruas tulang belakang janin (total 26 ruas, sehingga ruas ke 13 merupakan titik tengahnya)
- b. Dengan menggunakan busur, ruas ke 13 dijadikan titik tengah dan ruas pertama *servical* sebagai acuannya.
- c. Pada kelompok kontrol negatif, ukur sudut dari titik 0 derajat ke arah ruas pertama *servical*.
- d. Bila telah didapatkan berapa besar sudut pada kelompok kontrol negatif, lakukan hal pengukuran serupa pada kelompok lainnya lalu bandingkan.
- e. Sudut kelengkungan pada kelompok kontrol negatif digunakan sebagai acuan kelompok lainnya dikatakan cacat bila sudut yang didapat melebihi sudut kelompok kontrol negatif ini.

4.9 Analisis Data

Data – data hasil yang diperoleh dikelompokkan dan dimasukkan ke dalam tabel serta diuji kemaknaannya dengan menggunakan *One way Anova* untuk membandingkan hasil kehamilan berupa malformasi antar kelompok

perlakuan. Uji statistik dinyatakan bermakna bila $p < 0,05$. Semua perangkat analisis statistik menggunakan fasilitas software SPSS 16.0 dari Windows.

BAB V

HASIL DAN ANALISIS DATA

1.1 Hasil Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui efek pemberian ekstrak brokoli (*Brassica oleracea L.*) terhadap kejadian malformasi struktur anatomi vertebra pada janin tikus putih (*Rattus novergicus*) strain wistar yang disebabkan oleh kafein. Sebanyak 25 ekor tikus betina dikawinkan dengan 10 ekor tikus jantan. Bila ditemukan *vaginal plug*, maka dinyatakan hari ke-0 kehamilan. Seluruh kelompok diberi perlakuan selama 3 hari dimulai hari ke 9 kehamilan sampai hari ke 11 kehamilan, lalu dilakukan pembedahan pada hari ke-18 kehamilan. Kelompok hewan coba yang digunakan sebanyak 5 kelompok, yaitu: kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok kafein dan brokoli dosis 1, kelompok kafein dan brokoli dosis 2, dan kelompok kafein dan brokolis dosis 3. Kelompok kontrol positif merupakan kelompok yang diberi perlakuan penyuntikan kafein 80mg secara intraperitoneal sedangkan kelompok kafein dan brokoli dosis 1 sampai 3 adalah kelompok yang diberi perlakuan penyuntikan kafein 80mg secara intraperitoneal ditambah peroral ekstrak brokoli (dosis 1: 200mg; dosis 2: 400mg; dan dosis 3: 800mg). Setiap kelompok terdiri atas 5 ekor induk tikus.

Setelah dilakukan pembedahan, semua janin dalam keadaan mati dan akan dilakukan pewarnaan *alizarin red*. Setelah dilakukan pewarnaan *alizarin red*, dilanjutkan dengan pengamatan malformasi struktur anatomi pada sampel dengan menggunakan mikroskop stereo SZ61 Olympus dengan perbesaran 10 kali yang diberi OptiLab *software* sehingga dapat

langsung dihubungkan dengan laptop sebagai perekam dan pemotret sampel. Pengamatan malformasi struktur anatomi vertebra dilakukan pada semua sampel dari tiap kelompok, dimana malformasi struktur anatomi vertebra ditandai dengan terjadinya pembengkokan pada vertebra.

Pengambilan potret sampel pada setiap kelompok dilakukan dari tiga sisi tubuh janin, yaitu sisi kanan, sisi kiri, dan sisi bagian atas janin untuk melihat lebih jelas keberagaman cacat yang terjadi pada tulang belakang (jumlah ruas, kelainan bentuk seperti skoliosis dan pembengkokan tulang belakang).

Pada pengamatan kelompok kontrol negatif (-) yang tidak diberikan kafein dan ekstrak brokoli dengan jumlah sampel sebanyak 34 ekor didapatkan hasil jumlah ruas tulang belakang yang normal yaitu sebanyak 26 ruas, yang terdiri atas 7 ruas servikal; 13 ruas thorakal; dan 6 ruas lumbar serta didapatkan sudut tulang belakang adalah 11 derajat. Kelompok kontrol positif (+) yang hanya diberikan kafein 80 mg/KgBB dengan jumlah sampel sebanyak 38 ekor didapatkan hasil jumlah ruas tulang belakang yang cacat yaitu 1 ekor dengan jumlah ruas sebanyak 25 ruas dan 9 ekor dengan sudut tulang belakang yang mengalami pembengkokan yaitu lebih dari 11 derajat. Kelompok perlakuan dosis 1 (kafein 80mg/kgBB + ekstrak brokoli 200 mg/kgBB) dengan jumlah sampel sebanyak 37 ekor didapatkan hasil jumlah ruas tulang belakang yang normal dan sebanyak 12 ekor yang mengalami pembengkokan tulang belakang dengan sudut lebih dari 11 derajat. Kelompok perlakuan dosis 2 (kafein 80 mg/kgBB + ekstrak brokoli 400 mg/kgBB) dengan jumlah sampel sebanyak 42 ekor didapatkan hasil jumlah ruas tulang belakang yang cacat yaitu 1 ekor dengan jumlah ruas sebanyak

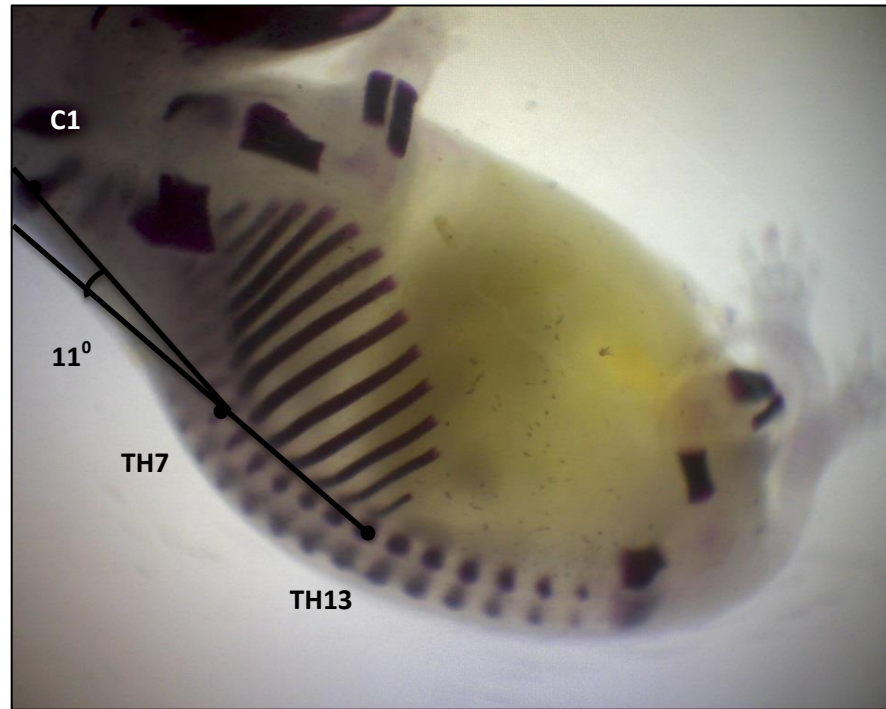
24 dan sebanyak 13 ekor yang mengalami pembengkokan sudut tulang belakang dengan besar sudut lebih dari 11 derajat. Kelompok perlakuan dosis 3 (kafein 80 mg/kgBB + ekstrak brokoli 800 mg/kgBB) dengan jumlah sampel 35 ekor didapatkan hasil jumlah ruang tulang belakang yang normal dan sebanyak 16 ekor yang mengalami pembengkokan sudut tulang belakang dengan besar sudut lebih dari 11 derajat.

Tabel 5.1 Data Hasil Penelitian

Kelompok Perlakuan	Σ Sampel Janin	Σ Kelainan Jumlah Ruas	Σ Kelainan Sudut Vertebra	Σ Kelainan Struktur Anatomi Vertebra
Kontrol (-)	34	0	0	0
Kontrol (+)	38	1	9	10
Perlakuan 1	37	0	12	12
Perlakuan 2	42	1	13	14
Perlakuan 3	35	0	16	16
Total	186	2	50	52

Dari hasil pengamatan yang telah dilakukan pada kelompok perlakuan didapatkan malformasi struktur anatomi vertebra yang ditandai dengan berkurangnya jumlah ruas tulang belakang dan membengkoknya tulang belakang janin, selain itu, terdapat pula kelainan morfologi lainnya yaitu terjadi celah palatum, jarak antar rusuk yang meregang, bengkoknya tulang belakang area lumbal, kulit janin yang pucat, teraba tubuh janin yang sangat lunak seperti tidak terbentuk sempurna penulangannya, tidak tumbuhnya janin (hanya segumpal darah, dibandingkan janin lain yang sudah terbentuk sempurna dalam satu kandungan) dan kematian janin.

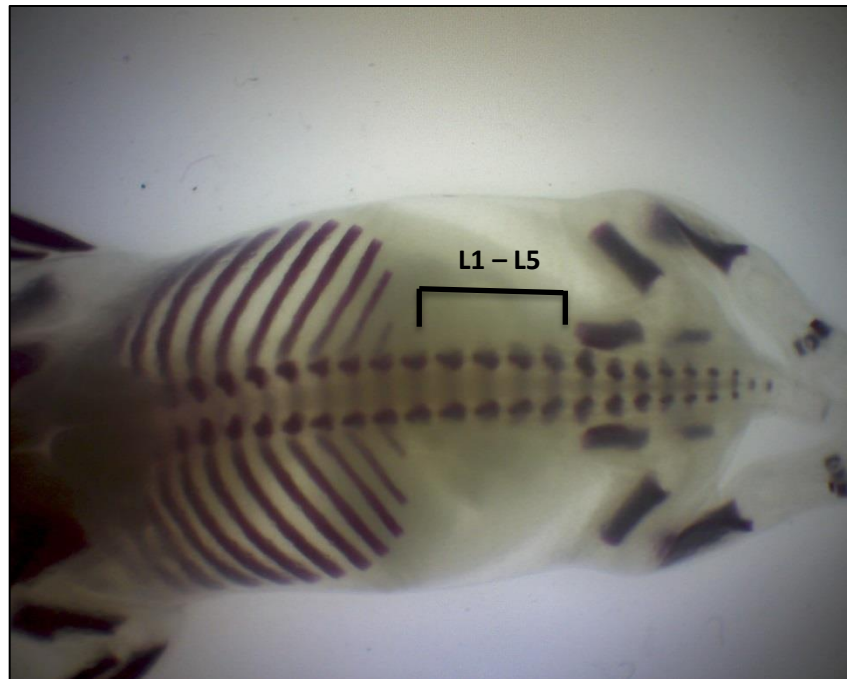
Pada berat badan dan panjang badan janin tidak terdapat adanya perbedaan yang signifikan pada masing – masing kelompok.



Gambar 5.1 Penampangan samping tubuh janin tikus dengan pewarnaan alizarin red. Tulang belakang yang normal : jumlah ruas tulang belakang sebanyak 26 pasang (servikal 7 pasang, thorakal dan rusuk 13 pasang, dan lumbal 6 pasang) dan sudut tulang belakang 11 derajat

Adapun gambar untuk hasil kelompok kontrol positif (+) dan ketiga kelompok perlakuan dengan hasil keadaan tulang belakang (jumlah ruas dan sudut kebengkokan tulang belakang) sebagai berikut :

Jumlah ruas tulang belakang janin :



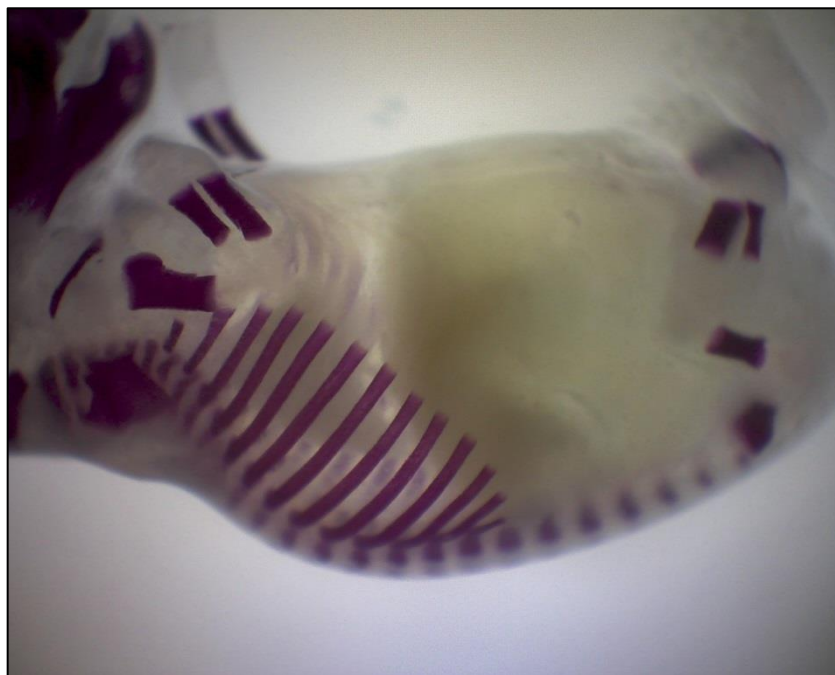
Gambar 5.2. Jumlah ruas tulang belakang pada kelompok kontrol positif (+) tidak normal (lumbal sebanyak 5 pasang) sebanyak 1 ekor janin



Gambar 5.3 Jumlah ruas tulang belakang pada seluruh janin dari kelompok perlakuan I normal yaitu sebanyak 26 pasang (servikal 7 pasang, thorakal dan rusuk 13 pasang, dan lumbal 6 pasang)

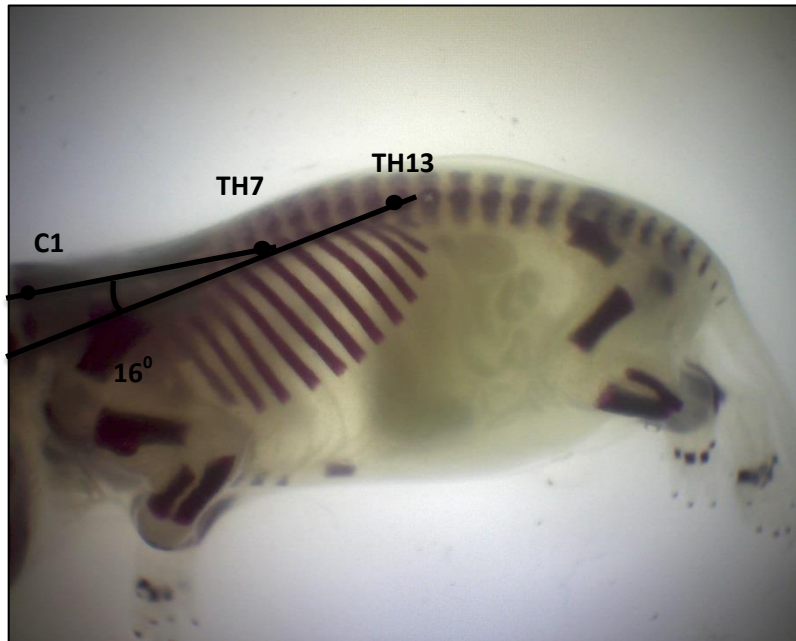


Gambar 5.4 Jumlah ruas tulang belakang pada kelompok perlakuan II tidak normal (sebanyak 11 pasang thorakal dan rusuk) sebanyak 1 ekor janin

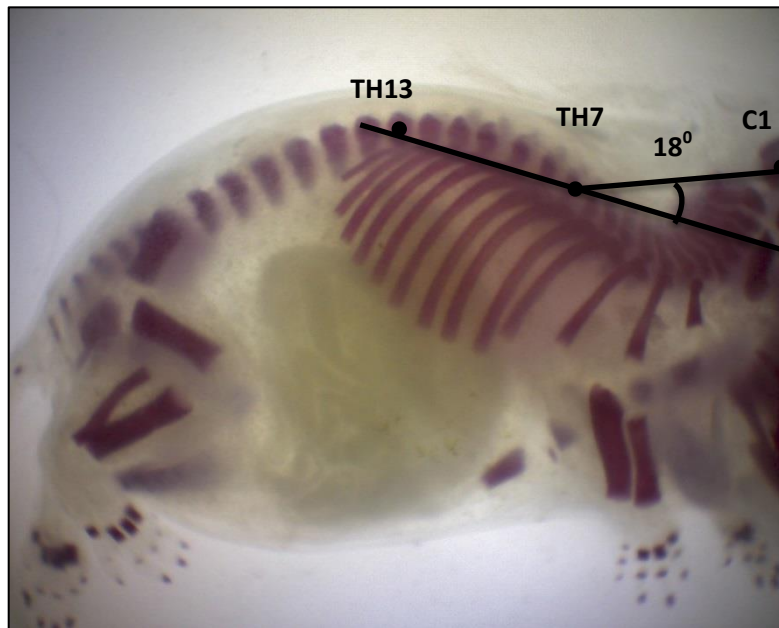


Gambar 5.5 Jumlah ruas tulang belakang pada seluruh janin dari kelompok perlakuan III normal yaitu sebanyak 26 pasang (servikal 7 pasang, thorakal dan rusuk 13 pasang, dan lumbal 6 pasang)

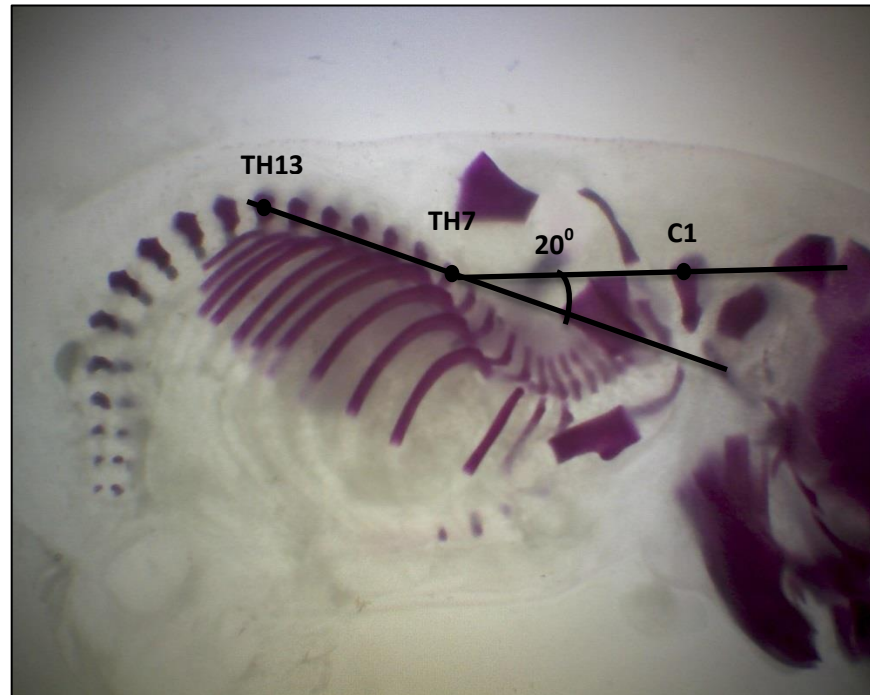
Sudut kebengkokan tulang belakang :



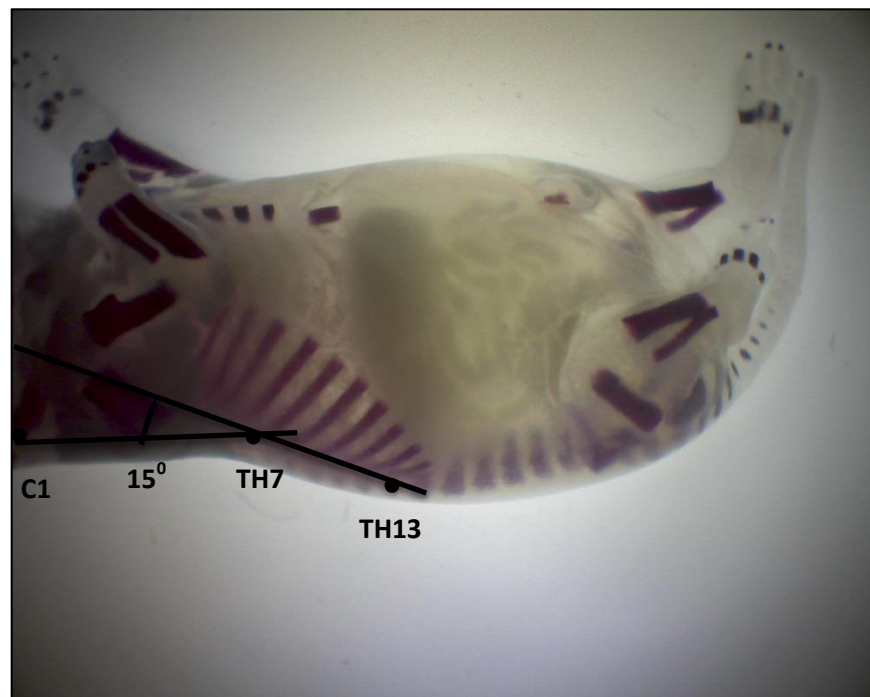
Gambar 5.6. Sudut kebengkokan tulang belakang pada kelompok kontrol positif (+) tidak normal yaitu 16 derajat pada 1 ekor janin dari 9 janin yang bengkok tulang belakang



Gambar 5.7. Sudut kebengkokan tulang belakang pada kelompok perlakuan I tidak normal yaitu 18 derajat pada 1 ekor janin dari 12 ekor yang bengkok tulang belakang



Gambar 5.8. Sudut kebengkokan tulang belakang pada kelompok perlakuan II tidak normal yaitu 20 derajat pada 1 ekor janin dari 13 ekor yang bengkok tulang belakang



Gambar 5.9. Sudut kebengkokan tulang belakang pada kelompok perlakuan III tidak normal yaitu 15 derajat pada 1 ekor janin dari 16 ekor yang bengkok tulang belakang

Terdapat juga gambar untuk kelainan lain yang terjadi pada janin kelompok kontrol positif (hanya kafein dengan dosis 80 mg/kgBB) :



Gambar 5.10 Janin Tikus Tidak Berkembang



Gambar 5.11 Kulit Janin Tampak Pucat

Terdapat juga gambar untuk kelainan lain pada janin dari kelompok perlakuan I (kafein dosis 80 mg/kgBB + ekstrak brokoli dosis 200 mg/kgBB) :



Gambar 5.12 Jarak Antar Rusuk Janin Terlihat Meregang



Gambar 5.13 Pada Tulang Belakang (Lumbal) Terlihat Melengkung



Gambar 5.14 Janin Tidak Terbentuk

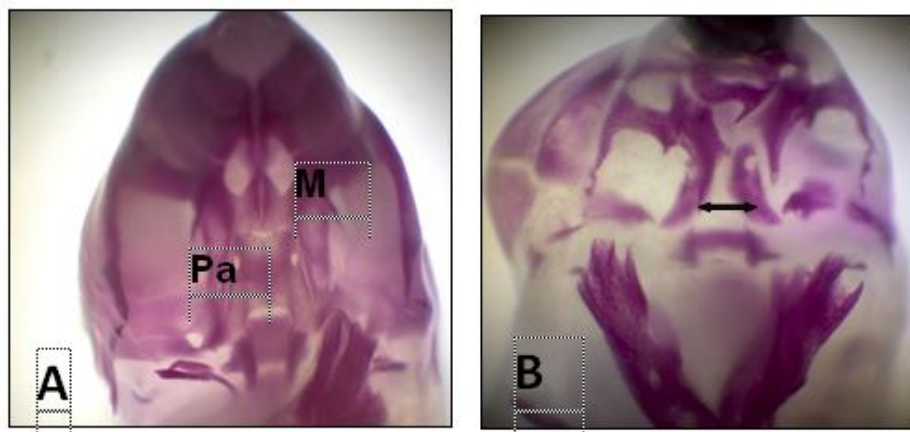


Gambar 5.15 Perkembangan Janin Tidak Sempurna dan Kulit Tampak Tidak Ada

Adapun gambar untuk kelainan lain pada janin kelompok perlakuan III
(Kafein dosis 80 mg/kgBB + ekstrak brokoli dosis 800 mg/kgBB) :



Gambar 5.16 Tulang Belakang (Lumbal) Tampak Melengkung



Gambar 5.17 Malformasi Pada Celah Palatum. A) Palatum Normal, B) Celah Palatum. Pa : Palatal, M : Maxilla

1.2 Analisa Data

Pada penelitian ini, dosis kafein 80 mg/kgBB dan ekstrak brokoli dengan tiga dosis yang berbeda merupakan variabel bebas. Sedangkan untuk variabel terikatnya adalah kelainan struktur anatomi vertebra. Penelitian ini merupakan uji parametrik, maka dari itu akan dilakuakn uji normalitas dan uji homogenitas terlebih dahulu. Setelah memenuhi seluruh

persyaratan, maka uji statistik dilakukan dengan menggunakan *One way ANOVA*. Analisa dilanjutkan dengan *Post Hoc Test* yang bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari hasil test ANOVA dengan menggunakan *Tukey HSD Test*. Untuk melengkapi hasil dari uji Tukey digunakan *Homogeneous Subsets* yang digunakan untuk mencari grup atau subset mana saja yang memiliki rata – rata (*Mean difference*) yang tidak berbeda secara signifikan.

Berdasarkan hasil pengamatan malformasi struktur anatomi vertebra menggunakan pewarnaan *alizarin red* dibawah mikroskop stereo SZ61 *Olympus*, dilakukan uji normalitas dan homogenitas data terlebih dahulu. Uji normalitas yang digunakan adalah *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel kurang dari 50. Dari hasil uji normalitas pada data malformasi struktur anatomi vertebra didapatkan nilai signifikansi sebesar 0.367. Nilai data tersebut lebih besar dari 0.05, maka dapat dinyatakan bahwa data yang dipakai menyebar dengan normal. Selanjutnya akan dilakukan uji homogenitas pada data malformasi struktur anatomi vertebra.

Uji *One way ANOVA* dilakukan apabila sudah melakukan uji homogenitas terlebih dahulu sebagai persyaratannya. Uji homogenitas dilakukan untuk membuktikan bahwa sampel memiliki kondisi yang sama (homogen). Berdasarkan hasil uji homogenitas, didapatkan bahwa nilai signifikansi pada data malformasi struktur anatomi vertebra adalah 0.505. Data yang digunakan adalah homogen berdasarkan hasil nilai uji homogenitas karena nilai signifikansi lebih dari 0.05.

Berdasarkan hasil uji normalitas dan uji homogenitas di atas, dapat dinyatakan bahwa data telah memenuhi syarat, sehingga pengujian dapat

dilakukan dengan menggunakan uji *One way* ANOVA dan didapatkan hasil nilai signifikansi $p=0.118$ untuk data malformasi struktur anatomi vertebra. Hasil tersebut menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan dari semua kelompok perlakuan, karena nilai signifikansi dari uji *One way* ANOVA dapat dikatakan signifikan bila kurang dari 0.05. Selanjutnya, analisis dilanjutkan dengan *Post Hoc Test* dengan menggunakan *Tukey HSD Test*

Tabel 5.1 Tabel Uji *Comparisons*

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Malformasi Struktur Anatomi Vertebra

Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K Neg	K Pos	-2.00	1.361	.593	-6.09	2.09
	200 ml	-2.40	1.361	.422	-6.49	1.69
	400 ml	-2.80	1.361	.278	-6.89	1.29
	800 ml	-4.00	1.444	.080	-8.34	.34
K Pos	K Neg	2.00	1.361	.593	-2.09	6.09
	200 ml	-.40	1.361	.998	-4.49	3.69
	400 ml	-.80	1.361	.975	-4.89	3.29
	800 ml	-2.00	1.444	.644	-6.34	2.34
200 ml	K Neg	2.40	1.361	.422	-1.69	6.49
	K Pos	.40	1.361	.998	-3.69	4.49
	400 ml	-.40	1.361	.998	-4.49	3.69
	800 ml	-1.60	1.444	.800	-5.94	2.74
400 ml	K Neg	2.80	1.361	.278	-1.29	6.89
	K Pos	.80	1.361	.975	-3.29	4.89
	200 ml	.40	1.361	.998	-3.69	4.49
	800 ml	-1.20	1.444	.918	-5.54	3.14
800 ml	K Neg	4.00	1.444	.080	-.34	8.34
	K Pos	2.00	1.444	.644	-2.34	6.34
	200 ml	1.60	1.444	.800	-2.74	5.94
	400 ml	1.20	1.444	.918	-3.14	5.54

Berdasarkan hasil uji *Tukey HSD Test* diatas, didapatkan hasil bahwa antara K (-) dengan K (+) terlihat perbedaan yang tidak bermakna dengan nilai signifikansi 0.59, dimana pada K (+) terdapat 1 ekor janin yang memiliki jumlah ruas tulang belakang kurang dari 26 dan 9 ekor janin yang memiliki sudut tulang belakang yang lebih dari 11 derajat, antar K (-) dengan P1 tidak terdapat perbedaan yang bermakna dengan nilai signifikansi 0.42, dimana P1 terdapat 12 ekor janin yang mengalami kebengkokan tulang belakang dengan sudut lebih dari 11 derajat dan tidak ada janin yang memiliki jumlah ruas tulang belakang dibawah normal (26 ruas), antara K (-) dengan P2 terdapat perbedaan yang tidak signifikan juga dengan nilai signifikansi 0.27, dimana P2 terdapat 1 ekor janin yang memiliki jumlah ruas tulang belakang kurang dari 26 ruas dan 13 ekor janin yang mengalami kebengkokan tulang belakang dengan jumlah sudut lebih dari 11 derajat, antara K (-) dengan P3 tidak terdapat perbedaan yang bermakna dengan nilai signifikansi 0.08, dimana pada P3 walaupun tidak ada janin dengan jumlah ruas tulang belakang dibawah normal namun terdapat 16 ekor janin yang mengalami kebengkokan tulang belakang, antara K (+) dengan P1 juga tidak memiliki perbedaan yang bermakna dengan nilai signifikansi 0.99, dimana pada P1 terdapat 12 ekor janin yang mengalami kebengkokan pada tulang belakangnya dan tidak ada janin yang memiliki jumlah ruas tulang belakang dibawah normal (26 ruas), antara K (+) dengan P2 juga tidak terdapat perbedaan yang bermakna dengan nilai signifikansi 0.97, dimana pada P2 terdapat 13 ekor janin yang mengalami kebengkokan pada tulang belakang dan terdapat 1 ekor janin yang memiliki jumlah ruas tulang belakang kurang dari 26 ruas, antara K

(+) dengan P3 tidak terdapat perbedaan yang bermakna dengan nilai signifikansi 0.64, dimana pada P3 walaupun tidak ada janin yang memiliki jumlah ruas tulang belakang dibawah normal (26 ruas), namun terdapat 16 ekor janin yang mengalami kebengkokan tulang belakang, antara P1 dengan P2 didapatkan perbedaan yang tidak bermakna dengan nilai signifikansi 0.99, antara P1 dengan P3 terdapat nilai signifikansi sebesar 0.80 yang artinya tidak terdapat perbedaan yang bermakna, dimana walaupun pada kedua kelompok tersebut tidak ada janin yang memiliki jumlah ruas tulang belakang dibawah normal (26 ruas), namun pada P1 terdapat 12 ekor janin yang mengalami kebengkokan dan pada P3 terdapat 16 ekor janin yang mengalami kebengkokan pada tulang belakang, antara P2 dengan P3 perbedaannya tidak bermakna dengan nilai signifikansi 0.91, dimana pada P2 terdapat 1 ekor janin yang memiliki jumlah ruas tulang belakang dibawah 26 ruas dan 13 ekor janin yang mengalami kebengkokan pada tulang belakang dan P3 terdapat 16 ekor janin yang mengalami kebengkokan tulang belakang. Dari hasil uji perbandingan antar 2 kelompok tersebut dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok. Walaupun tidak terdapat perbedaan yang bermakna, namun terjadi penambahan jumlah malformasi struktur anatomi pada kelompok perlakuan 1, 2, dan 3.

BAB VI

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini menggunakan beberapa uji statistik, yaitu uji *One way ANOVA* dan analisis *Post Hoc*. Selanjutnya pada data malfromasi struktur anatomi vertebra didapatkan hasil uji *One way ANOVA* dari data malfromasi struktur anatomi vertebra didapatkan nilai signifikansi $p=0.118$ ($p<0.05$) yang menunjukkan bahwa hasil dari data tersebut tidak didapatkan perbedaan yang signifikan dari semua kelompok perlakuan, dimana ini dapat disimpulkan bahwa dosis ekstrak brokoli serta kafein dapat berpengaruh terhadap kebengkokan sudut tulang belakang janin tikus namun hasil yang didapatkan belum bermakna.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol negatif tidak ditemukan adanya malfromasi struktur anatomi vertebra dari jumlah janin tikus sebanyak 34 ekor. Lalu pada kelompok kontrol positif dengan jumlah janin tikus sebanyak 34 ekor, terdapat 1 ekor janin yang memiliki jumlah ruang tulang belakang sebanyak 25 ruas (normalnya 26 ruas) dan 9 ekor janin tikus yang mengalami kebengkokan tulang belakang dengan dosis kafein 80 mg/kgBB yang mana berarti sekitar 29,4% kejadian malfromasi struktur anatomi vertebra disebabkan oleh kafein. Hasil ini didukung oleh penelitian yang menyebutkan bahwa kafein dengan konsentrasi 80 mg/kgBB dapat menyebabkan kelainan kongenital (Rashidi *et al*, 2014). Salah satu metabolit kafein yaitu paraxanthine dapat melewati sawar plasenta dengan bebas. Keadaan fetal yang belum bisa memproteksi diri sendiri mengakibatkan peningkatan sirkulasi katekolamin dan menginduksi terjadinya vasokonstriksi uteroplasental serta hipoksia fetal

yang mana hal ini dapat memicu gangguan pada pertumbuhan fetal (Jahanfar *et al.*, 2013). Paraxanthine juga merupakan derivat dari xanthine dimana terdapat XO (*xanthine oksidase*) yang merupakan sumber penting OFR (*Oxygene Free Radical*) (Valko *et al*, 2004). Kafein dapat memicu produksi radikal bebas serta peningkatan stres oksidatif, dimana kedua hal ini dapat menyebabkan peningkatan peroksidasi lipid dan menginduksi terjadinya vasokonstriksi maternofetal yang dapat menyebabkan iskemia dan mengakibatkan malformasi pada janin (Rashidi *et al*, 2014).

Pada kelompok perlakuan I (kafein 80 mg/kgBB + ekstrak brokoli 200 mg/kgBB), kelompok perlakuan II (kafein 80 mg/kgBB + ekstrak brokoli 400 mg/kgBB) dan kelompok perlakuan III (kafein 80 mg/kgBB + ekstrak brokoli 800 mg/kgBB) didapatkan hasil terjadinya malformasi struktur anatomi vertebra pada beberapa janin, secara berturut – turut jumlah janin yang mengalami cacat yaitu sebanyak 12 ekor, 13 ekor dan 16 ekor janin tikus pada kelompok – kelompok tersebut. Dapat dilihat berdasarkan hasil tersebut bahwa peningkatan dosis ekstrak brokoli dengan dibarengi pemberian kafein menunjukkan peningkatan kejadian malformasi pada struktur anatomi tulang belakang. Hal ini dapat diduga bahwa penyebab kejadian cacat dikarenakan interaksi antara kafein dengan ekstrak brokoli, dimana pemberian perlakuan dilakukan bersamaan. Kafein diberikan dengan dosis yang sama pada ketiga kelompok perlakuan sedangkan ekstrak brokoli diberikan dengan dosis yang berbeda tiap kelompok, dari sini dapat diasumsikan bahwa dosis brokoli yang terlalu tinggi dapat

menyebabkan interaksi dengan kafein dan menyebabkan terjadinya malformasi struktur anatomi tulang belakang.

Berdasarkan teori, penggunaan antioksidan yang melebihi batas dapat menyebabkan racun di dalam tubuh dan bersifat karsinogenik. Dalam brokoli terkandung flavonoid yang mana termasuk dalam golongan asam fenolik yang mana terkandung di dalam banyak bahan makanan termasuk sayuran (Jin et al, 2012). Sistem tubuh yang mengalami proses *redox-active metals* akan membuat flavonoid berubah sebagai senyawa yang pro oksidan. Sementara itu dengan adanya oksigen dan logam transisi seperti besi (Fe) dan tembaga (Cu) dapat menyebabkan peningkatan formasi ROS yang merusak DNA, lipid dan molekul biologis lainnya (Carocho et al, 2012). Hal ini juga didukung oleh penelitian yang menyatakan bahwa flavonoid dapat menjadi pro oksidan dalam kondisi tertentu bila terdapat logam transisi seperti besi (Fe) atau tembaga (Cu) yang meningkat dalam tubuh (Chobot et al, 2013). Dalam hal ini, ternyata didukung oleh teori yang menyatakan bahwa kafein, *theobromin*, dan *xanthine* dalam tubuh dapat bertindak sebagai pengikat Cu yang menyebabkan terjadinya proses *redox-active metals* (Anesini et al, 2011), yaitu Cu(I) akan teroksidasi menjadi Cu(II) dan akan menghasilkan radikal hidroksi (OH) pada superoksida yang didukung oleh reaksi fenton, dan proses ini menyebabkan kerusakan DNA (Chattopadhyay et al, 2014).

Pada penelitian ini, pemberian kafein yang bersamaan dengan pemberian brokoli 3 dosis (200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB, dan 800 mg/kgBB), dapat meningkatkan kerusakan DNA melalui proses *redox-active metals*. Kafein yang dapat menyebabkan *redox-active metals*

ditambah dengan flavonoid berlebihan yang dapat berubah menjadi pro oksidan, menyebabkan peningkatan terjadinya kerusakan DNA sehingga dapat memicu terjadinya malformasi struktur anatomi vertebra.

Berdasarkan hasil fakta dan teori pada penelitian ini, maka dapat diambil kesimpulan bahwa malformasi struktur anatomi vertebra terjadi pada kelompok kontrol positif (kafein 80mg/kgBB), kelompok perlakuan I, II, dan III (kafein 80mg/kgBB + ekstrak brokoli 200;400;800 mg/kgBB). Dibutuhkan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh ekstrak brokoli yang dapat menyebabkan malformasi tanpa adanya kafein dengan menambahkan kelompok perlakuan hanya ekstrak brokoli saja, serta penelitian mengenai rentang dosis ekstrak brokoli minimal yang dapat memberikan efek sebagai antioksidan.

BAB VII

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, didapatkan kesimpulan :

1. Pemberian kafein dengan dosis 80mg/kgBB pada hari kehamilan 9 – 11 dapat menyebabkan malformasi struktur anatomi vertebra berupa pembengkokan tulang belakang dan penurunan jumlah ruas tulang belakang pada janin.
2. Pemberian kafein 80mg/kgBB disertai brokoli dosis 200mg/kgBB, 400 mg/kgBB, dan 800 mg/kgBB dapat meningkatkan terjadinya malformasi struktur anatomi vertebra serta malformasi dalam bentuk lain, seperti celah palatum, tidak sempurnanya pembedahan janin, tulang lumbal yang membengkok (seperti skoliosis) dan kelainan lainnya.

7.2 Saran

Berdasarkan hasil kesimpulan penelitian di atas, dapat diajukan saran yaitu :

1. Dibutuhkan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh ekstrak brokoli dalam menimbulkan malformasi tanpa disertai dengan kafein, dan dibutuhkan kelompok perlakuan dengan hanya ekstrak brokoli

DAFTAR PUSTAKA

- Akbar, Budhi. 2010. *Tumbuhan Dengan Kandungan Senyawa Aktif yang Berpotensi Sebagai Bahan Antifertilitas*. Jakarta : Adabia Press
- Anesini, C., Turner,S., Cogoi, L., Filip, R. 2012. *Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (Ilex paraguariensis)*. *Food Science and Technology*. 45: 299-304.
- Armitage, David. 2004. *Rattus Norvegicus*. *Animal Diversity Web*. (On-line) http://animaldiversity.org/accounts/Rattus_norvegicus/ diakses pada 13 Mei 2016
- Arsana, I Nyoman. 2014. *Ekstrak Kulit Buah Manggis (Garcinia mangostana L.) dan Pelatihan Fisik Menurunkan Stres Oksidatif pada Tikus Wistar (Rattus norvegicus) Selama Aktivitas Fisik Maksimal*. Denpasar : Universitas Udayana
- Bangun, A.P. 2012. *Jus Buah dan Sayuran Untuk Mengatasi Kanker*. Jakarta: Agromedia Pustaka
- Carocho, M., Ferreira, C.F.R Isabel. 2013. *A Rewiev on Antioxidants, Prooxidants and Related Controversy: Natural and Synthetic Compound, Screening and Analysis Methodologies and Future Perspectives*. *Food and Chemical Toxicology*. 51: 15-25.
- Chattopadhyay, D., Somaiah, A., Raghunathan, D., Thirumurugan, K. 2014. *Dichotomous Effect of Caffeine, Curcumin, and Naringenin of Genomic DNA of Normal and Diabetic Subjects*. *Scientifica*. 1-7.
- Chobot, Vladimir, et al. 2013. *Versatile Redox Chemistry Complicates Antioxidant Capacity Assessment: Flavonoids as Milieu-Dependent Anti- anti Pro-oxidants*. *International Journal of Molecular Sciences*. 14: 11830 - 11841

Christensen, Kockrow. 2006. *Adult Health Nursing Fifth Edition*. Philadelphia: Mosby Company.

Cunningham, *et al.* 2014. *Obstetri Williams Edisi 23 Volume 2*. Jakarta : EGC.

Curtis, Glade B. 2000. *Kehamilan Diatas Usia 30*. Jakarta : Arcan.

Dalimartha, setiawan. 2000. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia*. Bogor : Trobus Agriwidya.

Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2012. *Materi Advokasi BBL*. Direktorat Jendral Bina Gizi da KIA. (Online)
<http://www.gizikia.depkes.go.id/wpcontent/uploads/downloads/2011/01/Materi-Advokasi-BBL.pdf> diakses pada 15 Mei 2016

Drews, U. 1996. *Atlas Berwarna dan Teks Embriologi*. Jakarta: Hipokrates

Erowid. 2011. *Caffeine Chemistry. The Vaults of Erowid*. (Online)
https://www.erowid.org/chemicals/caffeine/caffeine_chemistry.shtml
diakses pada 10 Mei 2016

Faturohman, Azhar A. 2014. *Pewarnaan Alizarin Red*. Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman.

Genetic Alliance. 2010. *Understanding Genetics: A District of Columbia Guide for Patients and Helath Professionals*. (Online)
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK132149/pdf/Bookshelf_NBK132149.pdf . diakses pada 14 Desember 2015.

Herbarium Medanense. 2012. *Identifikasi Tumbuhan*. Medan: Herbarium Medanense Sumatera Utara

Hernani dan Rahardjo. 2005. *Tanaman Berkhasiat Antioksidan*. Jakarta: Penebar Swadaya

- Hill, M.A. 2016. *UNSW Embryology* (16th ed.)
<<https://embryology.med.unsw.edu.au>> Diakses Tanggal 11 Mei 2016.
- Indrasanto,E., Effendi.S.H. 2006. *Pendekatan diagnosis kelainan bawaan menurut klasifikasi European Registration of Congenital Anomalies (EUROCAT)*. Dalam: *Buku Ajar Neonatologi*. Edisi Pertama. Jakarta: Badan Penerbit IDAI, 2008, 41-70.
- Jahanfar, Shayesteh. 2013. *Effect of Restricted Caffeine Intake by Mother on Fetal, Neonatal and Pregnancy Outcome*. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Published by John Wiley & Sons, Ltd.
- Jannah, Mujahidah Nida'ul. 2016. *Perbandingan Aktivitas Antioksidan dan Kadar Flavonoid Total Pada Bonggol Serta Daun Brokoli (Brassica oleracea L. cv. groups Broccoli)*. Bandung : Universitas Islam Bandung
- Jin, L., Zhang, Y., Yan, L., Guo, Y., Niu, L. 2012. Phenolic Compound and Antioxidant Activity of Bulb Extract of Six Liliaceae Species Native of China. *Molecules*. 17(8): 9361-78
- Khoury. dan Naclerio. 2006. *Immunology and Allergy*. In Bailey et al (eds.), *Head and Neck Surgery Otolaryngology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.p.335-49.
- Kikuzaki, H.,Hisamoto, M., Hirose, K., Akiyama,K., And Taniguchi, H. 2002. *Antioxidant Properties Of Ferulic Acid And Its Related Compounds*. *J.Agric.Food Chem.*, 50, 2161-2168
- Konje, C Justin. 2008. *Maternal Caffeine Intake During Pregnancy and Risk of Fetal Growth Restriction: A Large Prospective Observational Study*. *Department of Cancer Studies and Molecular Medicine: University of Leicester*

- Koolhaas, J. M. 2010. The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals, Eighth Edition. Hubrecht, R. & Kirkwood, J. (eds.). s.n., p. 311-326 16 p.
- Kurniasih, Sri. 2011. *Karakterisasi Simplisia Dan Uji Sitotoksitas Ekstrak Bunga Tumbuhan Brokoli (Brassica oleracea L. va. botrytis L.) Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BST)*. Medan: Universitas Sumatera Utara
- Lee, K-H, Fourle, JJ, Louw, WAN, Larson, CO, Joubert, G. 2009. *Medical Student "Use of Caffeine for Academic Purposes"*. Sa Fam Pract 200 9 51 (4): 322 – 327
- Lie, Steffe. 2010. *Efek Sari Kukusan Brokoli (Brassica oleracea var italica) Terhadap Gambaran Histopatologis Kolon Pada Mencit Model Kolitis Ulserativa*. Bandung: Universitas Kristen Maranatha.
- Marks, Dawn B, et al. 2000. *Biokimia Kedokteran Dasar*. Jakarta : EGC
- Misra, H., Mehta, D., Mehta, B.K., Soni, M., and Jain, D.C., 2008. *Study of Extraction and HPTLC-UV Method for Estimation of Caffeine in Marketed Tea (Camellia sinensis) Granules*. International Journal of Green Pharmacy: 47 – 51
- Moreno, D. A, M. Carvajal, C. LÓpez-Berenguer, C. García-Viguera. 2006. *Chemical and Biological Characterisation of Nutraceutical Compound of Broccoli*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 41(5): 1508-1522
- Mumin, A., Kazi, F.A., Zainal, A., Zakir, H., 2006. *Determination and Characterization of Caffeine in Tea, Coffee, and Soft Drink by Solid Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography (SPE – HPLC)*. Malaysian Journal of Chemistry, 8 : 45 – 51

- Nawrot, P., Jordan, S., Eastwood, J., Rotstein, J., Hugenholtz, A., and Feely, M. 2002. *Effect of Caffeine on Human Health. Food Additives and Contaminants* 20 (1): 1 – 30
- Nolan, M. 2004. *Kehamilan dan Melahirkan*. Jakarta: Arcan
- Prawirohardjo, S. 2008. *Fisiologi Kehamilan, Persalinan, Nifas, dan Bayi Baru Lahir*. In: Saifuddin AB, Wiknjosastro GH (eds.) *Ilmu Kebidanan*. 4th ed. Jakarta: PT Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo
- Puspitasari, Mega Leny dkk. 2016. *Aktivitas Antioksidan Suplemen Herbal Daun Sirsak (Annona muricata L.) dan Kulit Manggis (Garcinia mangostana L.)*. *Jurnal Pangan dan Agroindustri* Vol. 4 No 1 p.283-290.
- Rashidi, Fardokht, Mahmood, Khaksary-Mahabady Reza, Ranjbar, Hossein, Najafzadeh-Varzi. 2014. *The Effect of Essential Oil of Galbanum on Caffeine Induced-Cleft Palate in Rat Embryos*. *Zhedan Journal of Research In Medical Sciences*. 16(2):37-41
- Redha, Abdi. 2010. *Flavonoid Struktur Sifat Antioksidatif dan Peranannya Dalam Sistem Biologis*. *Journal Belian* Vol. 9 (2): 196 – 202
- Ruzaidi, Raihan Adlin Binti. 2013. *Efek Kafein Terhadap Kejadian Tremor Tangan Pada Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara Angkatan Tahun 2010*. Medan: Universitas Sumatera Utara
- Riswiyanto S., Ridla Bakri, Bayu Prawira R. 2005. *Studi Degradasi Zat Warna Tekstil (Alizarin Red-Direct Red 81) menggunakan Metode Fotokatalitik dengan Suspensi TiO₂ dan sinar UVC*. *Jurnal Universitas Indonesia* vol. 2(4). pp.33-40.
- Rubatzky, V. E. dan Yamaguchi, M. 1998. *Sayuran Dunia 2 : Prinsip, Produksi dan Nilai Nutrisi*. Jakarta: Agromedia Pustaka

- Sadler, T.W. 2009. *Embriologi Kedokteran Langman Edisi 10*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC
- Saminem. 2009. *Kehamilan Normal Seri Asuhan Kebidanan*. Jakarta: EGC
- Santoso, Heri Budi. 2004. *Kelainan Struktur Anatomi Skeleton Fetus Mencit Akibat Kafein*. Bioscientiae. Vol 1 (2): 23 - 30
- Santoso, S. 2004. *Kesehatan dan Gizi*. Cetakan kedua. Jakarta: PT. Asdi Mahasatya.
- Susantin, F et al. 2006. *Efek Teratogenik 2,5 Hexanodine Terhadap Perkembangan Fetus Mencit (Mus musculus)*. Jurnal Ilmu Dasar. 7(1): 52-58
- Tampubolon, M. H. 2000. *Efek Pemberian Sari Temulawak (Curcuma xanthorrhiza Roxb.) Terhadap Perkembangan Embrio Mencit (Mus musculus) Albino Strain DDW*. Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Tangkilisan, Helena Anneke. 2002. *Defisiensi Asam Folat*. Sari Pediatri, Vol. 4, No. 1, Juni 21 – 25.
- USDA. 2012. *National Nutrient Database for Standard Reference. Broccoli, Onion, Garlic, and Coriander*. United States: U.S: Departemet of Agriculture Nutrient Data Laboratory and Health
- Valko, Marian, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. 2004. *Role of Oxygen Radicals in DNA Damage and Cancer Incidence*. Molecular and Cellular Biochemistry 266: 37 – 56
- Weng, X., Roxana, Oudoli, De-Kun, Li. 2008. *Maternal Caffeine Consumption During Pregnancy and The Risk of Miscarriage. A Prospective Cohort Study*. American Journal of Obstetrics and Gynecology. 198(3): 279

- Widodo E. 2006. *Pajanan Asap Rokok Kretek Pada Tikus Putih Sebagai Model Untuk Manusia (Disertasi)*. Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Hal 19-21
- Winarsi, Hery. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius
- Young, V. S. L. 2001. *Teratogenicity and Drugs in Breast Milk* In *Applied Therapeutics: the Clinical Use of Drugs, Edisi 3*. Lippincott Williams and Wilkins. London
- Zakiah, N., dan Farn, M. 2011. *Uji Toksisitas Perkembangan Siprofloksasin dan Studi Histologi Terhadap Mencit Putih*. Sumatera Barat : Universitas Andalas.
- Quinonez, Shane C., Jeffrey W., Innis. 2013. *Human HOX Gene Disorders. Molecular Genetics and Metabolism*. 111 (2014): 4 -1 5